

**Dynamik der Aquaporine und des Wassertransports  
im elongierenden Hypokotyl  
von *Ricinus communis* L. Keimlingen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

**Daniel Augustinus Eisenbarth**

aus Langerringen

Bayreuth, im März 2004

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Tag der Einreichung: 12. März 2004

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 24. Juni 2004

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. E. Komor 1. Gutachter

Prof. Dr. E. Steudle 2. Gutachter

Prof. Dr. F. X. Schmid

Prof. Dr. B. Westermann

Prof. Dr. G. Rambold Vorsitzender

**Man soll auf alles achten,  
denn man kann alles deuten.**

**(Hermann Hesse)**



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Welche Bedeutung hat die Wasserleitfähigkeit zellulärer Membranen für das pflanzliche Streckungswachstum? .....	5
1.2	Welche Bedeutung haben die Aquaporine für das pflanzliche Streckungswachstum? .....	7
1.3	Welche Bedeutung haben Zuckertransporter für das pflanzliche Streckungswachstum? .....	8
1.4	Wie spielen molekulare Komponenten und biophysikalische Parameter während des pflanzlichen Streckungswachstums zusammen? .....	10
1.5	Anmerkungen .....	11
1.5.1	Nomenklatur der <i>MIP</i> .....	11
1.5.2	Begriff der "Expression" .....	11
1.5.3	Verwendete Anglizismen .....	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>13</b>
2.1	Kultivierung und Ernte von <i>Ricinus</i> -Keimlingen .....	13
2.2	Analyse des Hypokotyl-Streckungswachstums .....	13
2.3	Schwellungstests mit Protoplasten und Vakuolen .....	13
2.4	Messungen mit der Zelldrucksonde.....	15
2.4.1	Bestimmung der Verteilung zellulärer Größenparameter .....	15
2.4.2	Versuchsaufbau der Zelldrucksondenmessungen .....	16
2.4.3	Ablauf der Zelldrucksondenmessungen .....	17
2.4.4	Berechnungen der biophysikalischen Parameter des zellulären Wasserhaushalts .....	17
2.5	Isolierung vollständiger cDNA-Klone .....	21
2.5.1	cDNA-Bank <i>screening</i> .....	21
2.5.2	Klonierung und Identifikation vollständiger cDNA-Klone .....	22
2.6	Heterologe Expression der cDNA-Klone in Hefe .....	22
2.7	<i>Stopped-flow</i> Spektroskopie an <i>post-golgi</i> Vesikeln .....	22
2.8	Messungen des osmotischen Potentials.....	24
2.9	Identifizierung und Lokalisierung spezifischer Transkripte.....	24
2.9.1	RNA-Isolierung.....	24
2.9.2	Semiquantitative <i>RT-PCR</i> .....	24
2.9.3	Erstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden.....	25
2.9.4	Detektion von immobilisierter RNA ( <i>northern-blot</i> ) .....	26
2.9.5	<i>In situ</i> -Hybridisierung .....	27
2.10	Identifizierung und Lokalisierung spezifischer Proteine .....	28
2.10.1	Extraktion von Membranprotein .....	29
2.10.2	Immunodetektion von immobilisierten Proteinen ( <i>western-blot</i> ) .....	29
2.10.3	Immunolokalisierung .....	30
2.11	Grundlegende molekularbiologische Methoden .....	31
2.12	Bezugsquellen .....	31
2.13	Software und Statistik .....	31

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1	Die Elongation des <i>Ricinus</i> -Hypokotyls wird durch endogene Faktoren reguliert und durch Licht inhibiert .....	33
3.2	Die osmotische Wasserpermeabilität zellulärer Membranen wird entlang der Hypokotylachse reguliert .....	36
3.3	Stark elongierendes Hypokotyl zeigt eine spezifische radiale Verteilung der zellulären Wasserhaushaltsparameter .....	38
3.3.1	Radiale Verteilung des zellulären Volumens .....	38
3.3.2	Radiale Verteilung des Turgors ( $P$ ) .....	39
3.3.3	Radiale Verteilung des elastischen Moduls ( $\epsilon$ ) .....	40
3.3.4	Radiale Verteilung der Halbwertszeit zellulärer Druckrelaxationen ( $T_{1/2}$ ) .....	40
3.3.5	Radiale Verteilung der zellulären hydraulischen Leitfähigkeit ( $L_p$ ) .....	40
3.3.6	Der Wasserpotentialgradient ( $\Delta\Psi_o$ ) über den Hypokotylkortex .....	41
3.4	In Hypokotylgewebe von <i>Ricinus communis</i> konnten drei dominierende MIP-Gene identifiziert werden .....	42
3.4.1	Für <i>Ricinus communis</i> wurden zehn Vertreter der Familie der MIP identifiziert .....	42
3.4.2	Die Vollängenklone von <i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> codieren für potentiell funktionelle MIP .....	43
3.4.2.1	Nukleotid- und abgeleitete AS-Sequenz von <i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> .....	44
3.4.2.2	Strukturelle Voraussetzungen von <i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> für intrinsische Membranproteine .....	44
3.4.2.3	Strukturelle Voraussetzungen von <i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> für deren Substratspezifität .....	45
3.4.2.4	Strukturelle Voraussetzungen von <i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> für eine mögliche Regulation durch Proteinphosphorylierung .....	46
3.4.2.5	Strukturelle Voraussetzungen von <i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> für Sensitivität für Schwermetalle .....	48
3.4.3	<i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> aus <i>Ricinus communis</i> haben nahe verwandte Orthologe .....	48
3.5	<i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> aus Hypokotylgewebe sind funktionelle Wasserkanäle .....	51
3.5.1	Heterologe Expression von <i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	51
3.5.1.1	<i>RcPIP2-1</i> - und <i>RcTIP1-1</i> -transformierte Hefen exprimieren die spezifischen MIP-Transskripte .....	51
3.5.1.2	Die transformierten MIP <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> werden erfolgreich translatiert und in die Vesikelmembran inseriert .....	52
3.5.2	Post-Golgi Vesikelsuspensionen sind heterodispers .....	53
3.5.3	Post-Golgi Vesikel aus <i>RcPIP2-1</i> - und <i>RcTIP1-1</i> -transgenen Hefen bilden eine erhöhte osmotische Wasserpermeabilität aus .....	54
3.6	<i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> sind im Hypokotyl dominant exprimiert, jedoch unterschiedlich lokalisiert .....	57
3.6.1	Die Expression von <i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> korreliert entlang der Hypokotylachse unterschiedlich stark mit der Elongation .....	57
3.6.1.1	Auf Transkriptionsebene sind <i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> verstärkt in elongierendem Hypokotyl exprimiert .....	58
3.6.1.2	Auf Proteinebene korreliert nur die Ausprägung von <i>RcPIP2-1</i> mit der Elongation des <i>Ricinus</i> -Hypokotyls .....	60
3.6.2	Auf zellulärer Ebene zeigen <i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> im <i>Ricinus</i> -Hypokotyl unterschiedliche Expressionsmuster .....	62
3.6.2.1	Die Lokalisation von <i>RcPIP1-1</i> korreliert nicht mit der Zellexpansion .....	64
3.6.2.2	<i>RcPIP2-1</i> ist verstärkt in der Peripherie und dem lebenden Xylem des elongierenden Hypokotyls exprimiert .....	64
3.6.2.3	<i>RcTIP1-1</i> ist im Metaxylem lokalisiert und scheint im Parenchym zum Beginn der Elongation reduziert zu werden .....	67

<b>3.7 Die Expression von Zuckertransportern korreliert mit der Elongationsaktivität des <i>Ricinus</i>-Hypokotyls.....</b>	<b>71</b>
3.7.1 Entlang des Hypokotyls zeigen Saccharose- und Hexosecarrier eine transiente Expressionssteigerung.....	71
3.7.2 <i>RcSCR1</i> ist stark in Geleitzellen und Idioplasten des Hypokotyls exprimiert.....	72
<b>3.8 Entlang der Hypokotylachse korreliert der Gehalt an Stärkekörnern indirekt proportional mit der Zellgröße.....</b>	<b>73</b>
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>75</b>
<b>4.1 Die Wasserleitfähigkeit von Membranen stellt eine regula-tive Komponente für pflanzliches Streckungswachstum dar.....</b>	<b>76</b>
4.1.1 Die Elongation des <i>Ricinus</i> -Hypokotyls scheint auf eine erhöhte zelluläre Wasserpermeabilität zu basieren. ....	76
4.1.2 Der Wasserhaushalt peripherer Kortezellen scheint das Streckungswachstum des <i>Ricinus</i> -Hypokotyls zu determinieren ....	77
4.1.2.1 Radiale Verteilung der Zellvolumina.....	77
4.1.2.2 Radiale Verteilung des zellulären Turgors.....	77
4.1.2.3 Radiale Verteilung des elastischen Moduls der Zellwände.....	78
4.1.2.4 Radiale Verteilung der Halbwertszeiten zellulärer Druckrelaxationen .....	79
4.1.3 Im <i>Ricinus</i> -Hypokotyl deutet sich eine Limitierung des Streckungswachstums durch die hydraulische Gewebeleitfähigkeit an .....	79
<b>4.2 Das Aquaporin <i>RcPIP2-1</i> ist eine molekulare Komponente bei der Regulation des pflanzlichen Streckungswachstums .....</b>	<b>83</b>
4.2.1 <i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP3-1</i> sind intrinsische Membran-proteine .....	83
4.2.2 <i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> sind möglicherweise sensitiv für Quecksilberionen... ..	84
4.2.3 <i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> sind als orthodoxe MIP wahrscheinlich spezifisch für Wasser als Substrat.....	84
4.2.4 <i>RcPIP2-1</i> weist eine typische Phosphorylierungsdomäne auf .....	85
4.2.5 <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> sind funktionelle Wasserkanäle .....	86
4.2.6 Die Lokalisation von Aquaporinen im <i>Ricinus</i> -Hypokotyl deutet deren unterschiedliche physiologische Funktionen an .....	88
4.2.6.1 <i>RcPIP1-1</i> scheint konstitutiv exprimiert zu sein.....	88
4.2.6.2 <i>RcPIP2-1</i> zeigt ein charakteristisches Expressionsmuster in wachsendem Gewebe.....	89
4.2.6.3 <i>RcTIP1-1</i> könnte funktionell am zellulären Osmosehaushalt beteiligt sein.....	90
<b>4.3 <i>RcSCR1</i> könnte die Assimilatverteilung in <i>sink</i>-Organen determinieren .....</b>	<b>92</b>
<b>4.4 Der Stärkekatabolismus könnte eine treibende Kraft für das Streckungswachstum sein .....</b>	<b>93</b>
<b>4.5 Die Regulation des pflanzlichen Streckungswachstums ist komplex .....</b>	<b>93</b>
<b>4.6 Ausblick .....</b>	<b>95</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>6 Summary .....</b>	<b>99</b>
Literaturverzeichnis .....	121
<b>7 Anhang .....</b>	<b>113</b>
Abkürzungsverzeichnis .....	117
Abbildungsverzeichnis .....	119
Tabellenverzeichnis .....	121





---

# 1 Einleitung

Den gegenwärtigen Nobelpreis für Chemie tragen Roderick MacKinnon und der amerikanische Biochemiker und Mediziner Peter Agre für ihre "...discoveries concerning channels in cell membranes" (The Nobel Foundation, 2003). Peter Agre wurde im Speziellen geehrt "for the discovery of water channels" (The Nobel Foundation, 2003), die mit der Entdeckung des ersten humanen Aquaporins durch seine Arbeitsgruppe an der *Johns Hopkins University School of Medicine (Baltimore, USA)* seinen Anfang nahm (Denker et al., 1988). Das entdeckte *channel forming integral protein* kommt in den Membranen der Erythrocyten und Nierentubuli des Menschen vor und wurde aufgrund seines Molekulargewichts von 28 Kilodalton als CHIP28 bezeichnet. Seine, für das Verständnis des transmembranen Wassertransports, wohl bedeutendste Arbeit gelang Peter Agre, indem er nachwies, dass CHIP28 die osmotische Wasserpermeabilität über biologische Membranen um mehr als das 16-fache erhöhen konnte (Preston et al., 1992). Im darauf folgenden Jahr führten Maurel et al. (1993) den gleichen Nachweis zur Funktion des pflanzlichen Aquaporins  $\gamma$ -TIP aus *Arabidopsis thaliana*. Beide Arbeiten hatten eine ungeheure Motorwirkung auf die wissenschaftliche Erforschung der Aquaporine als molekulare Komponente des transmembranen Wasserflusses in biologischen Systemen zur Folge. Bald zeichnete sich ab, dass Aquaporine einer umfangreichen Genfamilie entstammen, deren Vertreter in sämtlichen Organismenreichen vorkommen. Namensgebend für diese Genfamilie war das *major intrinsic protein (MIP)* in Zellmembranen der Augenlinse bei Rind (Reizer et al., 1993). Schon bei dessen Entdeckung wurde spekuliert, dass es eine molekulare Komponente des Wasserflusses über biologische Membranen sein könnte (Gorin et al., 1984).

Heute ist bekannt, dass Gene aus der Familie der *MIP* für intrinsische Membranproteine mit einem Molekulargewicht von 26 - 34 Kilodalton codieren. Diese Proteine sind aus sechs transmembranen  $\alpha$ -Helices (Helix 1-6), fünf interhelikalen Schleifen (Schleife A-E) sowie cytosolischen N- und C-Termini aufgebaut. Die Schleifen B und E bilden mit jeweils einem kurzen hydrophoben Abschnitt und einem stark konservierten hydrophilen Motiv (Asparagin-Prolin-Alanin) eine hygroskopische Pore nach dem Sanduhr-Modell (Jung et al., 1994). Innerhalb der Membran aggregieren Aquaporine zu Homotetrameren (Engel et al., 2000), obgleich jedes Monomer einen funktionellen Wasserkanal ausbildet (Jung et al., 1994).

In Pflanzen scheint die Familie der *MIP* zu einer hohen funktionellen und genetischen Diversität gelangt zu sein (Santoni et al., 2000; Tyerman et al., 2002). Während in Tieren bis heute ca. zehn Vertreter der *MIP* identifiziert worden sind (Verkman & Mitra, 2000), scheint es in Pflanzen eine vielfache Anzahl dieser Homologe zu geben. So weist beispielsweise *Arabidopsis thaliana* 35 (Johanson et al., 2001), *Zea mays* 31 (Chaumont et al., 2000) und *Ricinus communis* mindestens zehn Homologe aus der Familie der *MIP* auf (Weig & Eisenbarth, 2000). Anhand des "...complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis*..." (Johanson et al., 2001) wurde die Familie der *MIP*-Gene aus *Arabidopsis thaliana* in vier Unterfamilien gegliedert. Die größte Unterfamilie bilden die *plasmalemma intrinsic prote-*

*ins* (PIP), welche zusammen mit den *tonoplast intrinsic proteins* (TIP) nach ihrer subzellulären Lokalisation benannt wurden und funktionell als "orthodoxe" Aquaporine gelten. Eine dritte umfangreiche Unterfamilie bilden die *nodulin-like intrinsic proteins* (NIP), die nach dem *NOD26* aus Wurzelknöllchen von *Glycine max* benannt wurden. Sie können wie dieses Homolog gleichermaßen Wasser und Glycerin transportieren und werden demnach als Aquaglyceroporine bezeichnet. Die kleinste Unterfamilie der MIP stellen die *small intrinsic proteins* (SIP), welche eine deutlich abweichende Struktur aufweisen und über deren Funktion bis dato keine Erkenntnisse vorliegen. Die einzelnen Unterfamilien sind weiter in mehrere Gruppen unterteilt. So teilen sich beispielsweise die PIP in die beiden Gruppen PIP1 und PIP2 auf, die TIP in die sechs Gruppen TIP1 - TIP6. Eine sehr ähnliche Untergliederung wurde auch in der Monokotyledonen *Zea mays* beschrieben (Chaumont et al., 2001).

Analog zur genetischen Diversität weisen pflanzliche MIP eine weite Bandbreite verschiedener Transportselektivitäten auf. Sie reicht vom Wassertransport (z. B. Maurel et al., 1993), über den Transport kleiner ungeladener Teilchen (z. B. Rivers et al., 1997; Dordas et al., 2000; Weig & Jakob, 2000) bis zur Permeation von Kohlendioxid (Uehlein et al., 2003). Dabei weisen viele pflanzliche MIP Mischformen der Transportselektivität auf (z. B. Rivers et al., 1997; Klebl et al., 2003), weswegen eine funktionelle Einteilung in Aquaporine und Aquaglyceroporine ihre Grenzen hat.

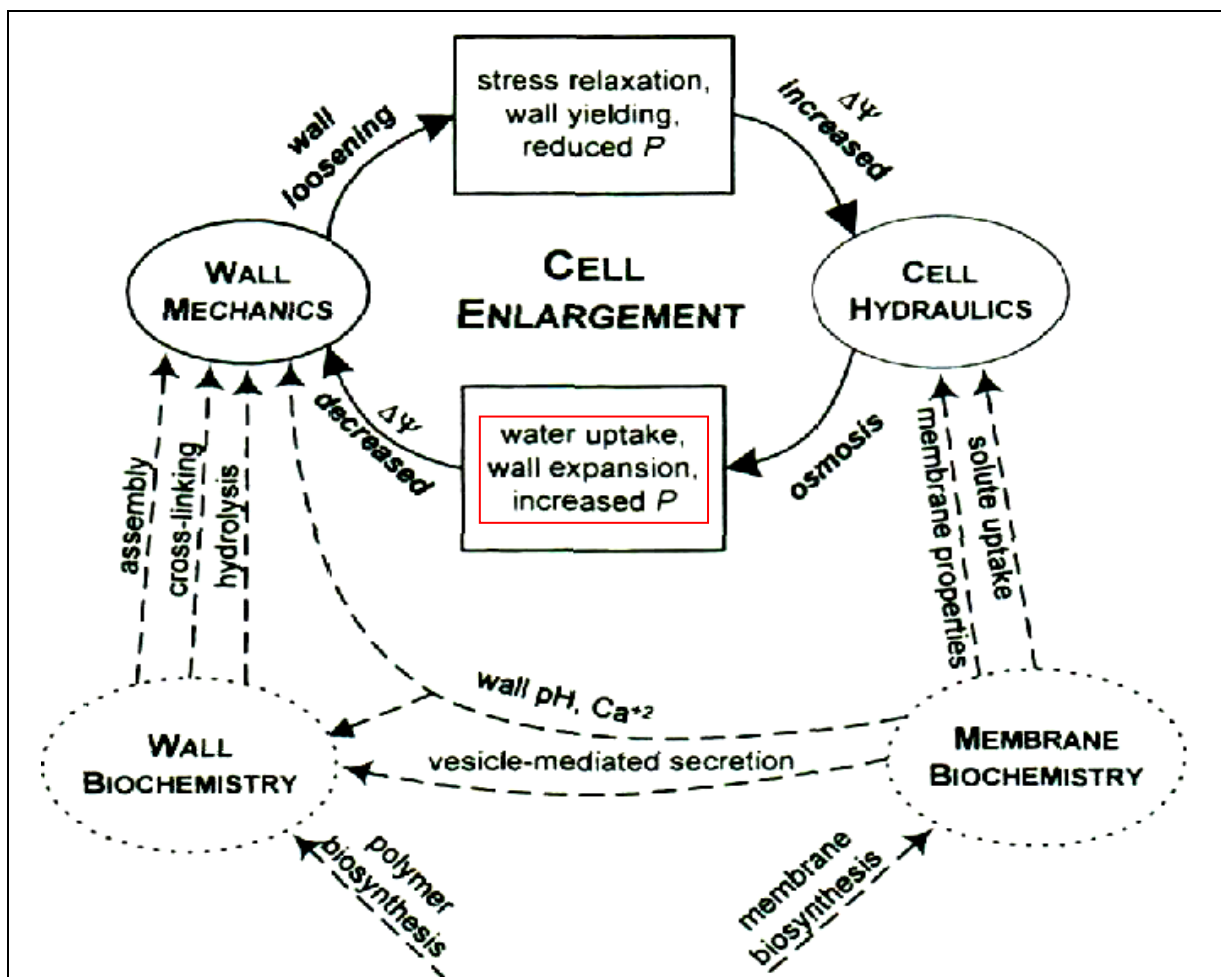
Inzwischen ist die Erkenntnisfülle über die genetische Organisation, die zelluläre Lokalisation und die verschiedenen Transportaktivitäten pflanzlicher Aquaporine enorm (z. B. Santoni et al., 2000; Tyerman et al., 2002). Im Gegensatz dazu ist die Frage nach der physiologischen Relevanz von Aquaporin-vermitteltem Wassertransport bzw. der Wirkungsweise, wie Aquaporine als funktionelle Komponente in physiologische Vorgänge einer Pflanze integriert sind, nur unzureichend geklärt. Einen Beitrag zu Beantwortung dieser Fragen soll die vorliegende Arbeit leisten.

Lange vor der Entdeckung der ersten Aquaporine zeigten Paganelli & Solomon (1957), dass die Permeabilität menschlicher Erythrocytenmembranen für osmotisch getriebenen Wasserfluss höher ist als für den Austausch von Wasser per Diffusion. Mit diesem Befund untermauerte Dainty (1963) seine Hypothese von der Existenz wasserleitender Poren in biologischen Membranen, welche parallel zur Diffusion einen Massenfluss von Wassermolekülen durch die doppelte Lipidschicht ermöglichen. Erst 1990 lieferten Wayne & Tazawa durch Messungen von transzellulärer Osmose an Internodien von *Nitellopsis obtusa*, den Nachweis für die Existenz eines hocheffizienten, Protein-vermittelten Transportwegs für Wasser über zelluläre Membranen. Zwei Jahre später gelang schließlich Peter Agre der endgültige Brückenschlag zwischen den biophysikalischen Befunden hoher zellulärer Wasserpermeabilitäten und den Aquaporinen als deren molekulare Grundlage (Preston et al., 1992).

Nach Finkelstein (1987) besitzt eine reine Phospholipid-Doppelschicht die osmotische Wasserpermeabilität von  $\sim 1 \mu\text{m/s}$ . Die höchste osmotische Wasserleitfähigkeit biologischer Membranen wurde mit  $\sim 1200 \mu\text{m/s}$  im Kortex von wachsendem Erbsen-Epikotyl gemessen (Cosgrove & Steudle, 1981). Sie veranschaulicht die hohe Kapazität von Pflanzenzellen, mit Hilfe von Aquaporinen große Mengen Wasser in kurzer Zeit austauschen zu können.

Zwei physiologische Vorgänge, bei denen augenscheinlich ein besonders schneller Wasserfluss über pflanzliche Zellmembranen notwendig ist, sind die nastischen Bewegungen der Pulvini von *Mimosa pudica* und die Schließbewegungen der Stomata. An beiden Vorgängen scheinen Aquaporine funktionell beteiligt zu sein (Fleurat-Lessard et al., 1997; Sarda et al., 1997).

Ein weiterer physiologischer Vorgang, bei dem in relativ kurzer Zeit relativ große Mengen Wasser über Membranen fließen, ist das Expansionswachstum pflanzlicher Zellen. Es vollzieht sich in erster Linie hinter der Determinationszone des Sproß- bzw. Wurzelscheitels und führt zu einer 10- bis 1000-fachen Vergrößerung des Zellvolumens (Cosgrove, 1997). Allein dieses zelluläre Expansionswachstum bedingt die Länge pflanzlicher Spross- bzw. Wurzelachsen. Es impliziert eine Vielzahl biophysikalischer und biochemischer Prozesse (Abb. 1, Cosgrove, 1997), lässt sich im Wesentlichen jedoch durch drei biophysikalische Parameter beschreiben.



**Abb. 1: Das Expansionswachstum pflanzlicher Zellen und die involvierten Prozesse (schematische Übersicht aus Cosgrove, 1997)**

Biophysikalische Prozesse, die unmittelbar zum Expansionswachstums pflanzlicher Zellen beitragen, sind mit durchgezogenen Linien gekennzeichnet. Biochemische Vorgänge, welche an diesen Prozessen beteiligt sind, werden durch gestrichelte Linien repräsentiert. Die drei zentralen biophysikalischen Prozesse sind rot umrandet.

Als treibende Kraft für die Volumenzunahme der Zelle fungiert der Zellturgor. Er entsteht durch einen nach außen gerichteten Gradienten des osmotischen Potentials, welcher durch aktive Aufnahme von osmotisch wirksamen Substanzen (z. B. Ionen, Zucker, org. Säuren) aufgebaut und aufrechterhalten wird. Bei nicht-expandierenden Zellen steht das osmotische Potential im Gleichgewicht mit dem Turgorpotential. Dies führt zu einem Wasserpotentialgradienten von Null zwischen dem Zellinnern und der zellulären Umgebung (Apoplast). Bei expandierenden Zellen kommt ein weiterer Parameter zum Tragen, die Extensibilität der Zellwand. Als Grundvoraussetzung für die Volumenvergrößerung pflanzlicher Zellen führt die plastisch verformbare Zellwand zu einem verringertem Druckpotential und damit zu einem einwärts gerichteten Gradienten des Wasserpotentials (Cosgrove, 1997). Dieser zieht einen passiven Einstrom von Wasser in das Zelllumen nach sich. Hierbei kommt der dritte Parameter pflanzlichen Expansionswachstums zum Tragen, die Wasserleitfähigkeit der Zellmembranen. Findet ein Nettoeinstrom von Wasser in expandierende Zellen statt, so stellen die Membranen einen weiteren Widerstand (= reziproke Leitfähigkeit) für deren Volumenvergrößerung dar. Für eine pflanzliche Zelle sind dabei die Leitfähigkeiten sowohl des Plasmalemma als auch des Tonoplasten von Belang, da die Vakuole nahezu vollständig das Volumen der Zelle ausfüllt. Damit ist ein Volumenzuwachs größtenteils mit der Aufnahme von Wasser in die Vakuole verbunden. Da es jedoch Hinweise gibt, dass die Wasserleitfähigkeit pflanzlicher Tonoplasten enorm hoch ist (Maurel et al., 1997), fällt sie gegenüber der Wasserleitfähigkeit des Plasmalemmas wahrscheinlich wenig ins Gewicht. Während des Expansionswachstums einer Pflanzenzelle stehen also die aktive Aufnahme von Osmotika, der passive Nachstrom von Wasser und die plastische Ausdehnung der Zellwand in einem Gleichgewicht. Die funktionellen Komponenten für die aktive Aufnahme von Osmotika in pflanzliche Zellen sind die verschiedensten Carrier bzw. Ionentransporter (Überblick in Tanner & Caspari, 1996). Die molekulare Grundlage für den erleichterten Wasserfluss über zelluläre Membranen sind die Aquaporine (Überblick in Tyerman et al., 1999) und für die plastische Extensibilität der Zellwand die Expansine sowie andere Zellwandkomponenten (Überblick in Cosgrove, 2001).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf dem Parameter der Wasserleitfähigkeit pflanzlicher Zellmembranen und seinen molekularen Komponenten, den Aquaporinen. Deren physiologische Rolle während des Expansionswachstums pflanzlicher Zellen sollte eingehender untersucht werden.

Ein Pflanzenorgan, an dem zelluläres Expansionswachstum besonders deutlich in Erscheinung tritt, ist das etiolierte Hypokotyl des Keimlings von *Ricinus communis*. Als typischer Keimstängel höherer Pflanzen setzt sich dieses Organ folgendermaßen zusammen: Im apikalen Meristem werden die Zellen des Hypokotyls gebildet und zeigen sehr rege Teilungsaktivität in der unmittelbar basipetal folgenden Zellteilungszone. Assimilate aus dem Endosperm werden über das Phloem in diese Zone transportiert und nach Aufnahme in die Zellen in Form transitorischer Stärkekörner gespeichert (Balane, 1997). Die Zellteilungszone geht in den Hypokotylhaken über, der sich durch eine unterschiedliche Elongationsaktivität seiner Innen- und Außenseite bildet. An dessen basipetale Seite schließt sich die sogenann-

te Elongationszone an. In dieser Zone vollzieht sich das gesamte Expansionswachstum der Hypokotylzellen, was morphologisch an seinem starken Längenwachstum zu erkennen ist. Dabei wird die gespeicherte Stärke wieder remobilisiert, und verstärkt Assimilate und Wasser aus den Leitgeweben aufgenommen (Köckenberger, 1994; Balane, 1997). Nach Vollendung der Expansion bilden die Hypokotylzellen acropetal zum Wurzelhals die Zone des ausgereiften Hypokotyls. Die großlumigen Zellen dieser Zone werden vollständig von der Vakuole ausgefüllt und weisen kaum mehr Speicherstärke auf.

Das *Ricinus*-Hypokotyl repräsentiert somit eine Achse, entlang derer das Expansionswachstum pflanzlicher Zellen in einer räumlich und zeitlich festgelegten Abfolge erfolgt. Andere physiologische und morphologische Vorgänge (Blattorganbildung, Verzweigung, Assimilation usw.) treten dabei nicht auf. Daher sollten alle biophysikalischen Parameter und molekularen Komponenten, die innerhalb dieser Zone eine transiente Veränderung vollziehen, vornehmlich an der Zellexpansion beteiligt sein.

Als Modell für Studien des Expansionswachstums pflanzlicher Zellen weist das Hypokotyl des *Ricinus*-Keimlings weitere Vorteile auf: Der Keimling ist groß (5-10 cm), wächst schnell und gleichmäßig, ist also leicht zu handhaben und permanent in vergleichbarer Form verfügbar. Das Hypokotyl eignet sich aufgrund seiner Größe sehr gut für physiologische Messungen mit der Zelldrucksonde sowie die Isolation von Protoplasten und Vakuolen bzw. von RNA und Protein. Es bietet darüber hinaus mit einem Durchmesser von 2-6 mm ein relativ mächtiges Gewebe. Hier kommen in radialer Richtung limitierende Parameter möglicherweise stärker zum Tragen (siehe unten), als beispielsweise im wenige Zellschichten dicken Hypokotyl von *Arabidopsis thaliana* (Gendreau et al., 1997). Darüber hinaus kann auch das Elongationswachstum des *Ricinus*-Keimlings durch Belichtung schnell und vollständig inhibiert werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, die Bedeutung funktioneller Komponenten des zellulären Expansionswachstums über die Inhibition der Elongation durch ein exogenes Signal zu überprüfen.

## **1.1 Welche Bedeutung hat die Wasserleitfähigkeit zellulärer Membranen für das pflanzliche Streckungswachstum?**

Der Volumenzuwachs expandierender Pflanzenzellen entspricht nahezu vollständig dem Volumen von Wasser, das über die Zellmembranen (Plasmalemma & Tonoplast) aufgenommen wurde. Gerade die stark expandierenden Pflanzenzellen können eine enorm hohe Leitfähigkeit für Wasser aufweisen (Cosgrove & Steudle, 1981). Bis heute ist jedoch ungeklärt, warum derart hohe hydraulische Leitfähigkeiten während des Expansionswachstums pflanzlicher Zellen physiologisch relevant zu sein scheinen. Eine mögliche Erklärung dazu wurde immer wieder kontrovers diskutiert (Boyer, 1985; Cosgrove, 1986; Steudle, 1994):

Der hydraulische Widerstand zellulärer Membranen und somit die Aufnahme von Wasser ist ko-limitierend für die Zellexpansion. Diese Limitierung kommt insbesondere dann zum Tragen, wenn die expandierenden, wasseraufnehmenden Zellen nicht in unmittelbarer Nähe der wasserversorgenden Leitungsbahnen (Xylem) liegen. In diesem Falle müsste Wasserfluss

über mehrere Zellschichten erfolgen, die als in Reihe geschalteten hydraulischen Widerstände wirken. Für die ungehinderte Elongation des Gewebes müsste das Produkt der Wasserleitfähigkeiten peripherer Zellschichten also derart hoch sein, dass eine Limitierung nicht auftritt. Sollte die Wasserleitfähigkeit von Membranen an der Regulation dieses Volumenwachstums beteiligt sein, müsste sie während der Zellexpansion transient erhöht, und unter nicht-elongierenden Bedingungen auf ein limitierendes Niveau reduziert werden können.

Gegen eine Limitierung der hydraulischen Eigenschaften während des pflanzlichen Volumenwachstums spricht die Kapazität der beteiligten Zellen, in sehr kurzen Zeitspannen (wenige Sekunden) Wasser austauschen zu können (Cosgrove & Steudle, 1981; Steudle, 1994). Dagegen ist der Zeitrahmen des Elongationswachstums, also der Zeitraum in dem Wasser in expandierende Zellen fließt, relativ lang (Stunden bis Tage). Da also Zellen expandierender Gewebe vergleichsweise hohe hydraulische Leitfähigkeiten aufweisen, scheint deren Kapazität für schnellen Wasseraustausch höher zu sein, als es das Volumenwachstum erfordert.

Trotzdem wurde im Kortex von elongierendem Soja-Hypokotyl ein beträchtlicher radialer Gradient des Wasserpotentials gemessen, was auf eine (Ko-)Limitierung des hydraulischen Widerstands während des Expansionswachstums pflanzlicher Zellen hinweist (Nonami & Boyer, 1993). Als den radialen Wasserfluss kontrollierende Barriere werden in diesem Zusammenhang kleine Zellen des Xylemparenchyms (Tang & Boyer, 2002) bzw. die Leitbündelscheide diskutiert (Fricke, 2002). Somit scheint das Volumenwachstum pflanzlicher Gewebe auch über eine Modifikation der hydraulischen Leitfähigkeit bestimmter zellulärer Membranen reguliert werden zu können. Meshcheryakov et al. (1992) konnten in elongierendem *Ricinus*-Hypokotyl zwar keine messbaren radialen Gradienten des Wasserpotentials nachweisen, stellten aber das Vorhandensein geringer Wasserpotentialgradienten als treibende Kraft für die Wasseraufnahme in expandierende Zellen außer Zweifel.

Nach Cosgrove (1986, 1993 & 1997) ist der wesentlichste biophysikalische Parameter, über den das Expansionswachstum pflanzlicher Zellen reguliert wird, eine veränderbare plastische Extensibilität der Zellwand. Als mechanische Barriere scheint dabei die Epidermis von elementarer Bedeutung zu sein (Peters & Tomos, 1996), obgleich auch den zentral liegenden Geweben eine aktive Beteiligung an der Kontrolle des Wachstums pflanzlicher Organe zukommen soll (Peters & Tomos, 2000). Als molekulare Komponenten für die wachstumsabhängige Modifikation der Zellwandextensibilität sind neben unterschiedlichen Zellwandbestandteilen auch die sogenannten Expansine identifiziert worden (McQueen-Mason et al., 1992). Sie lösen eine wachstumsinduzierte Erweichung der Zellwand aus, indem sie pH-abhängig die Bindung zwischen Zellulosefibrillen und der Hemizellulose lockern (Cosgrove, 1998). Obgleich Expansine damit eine wichtige Rolle während der Zellexpansion spielen, scheinen sie nicht die einzige molekulare Komponente bei der Regulation von pflanzlichem Elongationswachstum zu sein (Caderas et al., 2000).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde nun anhand des Hypokotyls von *Ricinus*-Keimlingen herausgearbeitet, inwieweit die Wasserleitfähigkeit zellulärer Membranen in die Regulation des Expansionswachstums pflanzlicher Zellen involviert ist. Um die Erheblichkeit der hydraulischen Leitfähigkeit für die Elongation des *Ricinus*-Hypokotyls besser beurteilen zu können,

wurden darüber hinaus weitere Parameter des zellulären Wasserhaushalts (Turgor, elastisches Modul, Zellvolumina) betrachtet. Dazu wurden folgende Fragestellungen experimentell bearbeitet:

- In welchem zeitlichen und räumlichen Rahmen wird die Elongation des *Ricinus*-Hypokotyls reguliert?
- Korreliert die Elongationsaktivität entlang des Hypokotyls mit einer Veränderung der osmotischen Wasserpermeabilität zellulärer Membranen?
- Gibt es zwischen Hypokotylzonen mit unterschiedlichen Zellstreckungsaktivitäten charakteristische Unterschiede in der radialen Verteilung der Wasserleitfähigkeit (des Turgors, des elastischen Moduls, der Halbwertszeit zellulärer Druckrelaxationen)?
- Sind Aquaporine die molekulare Grundlage für hohe zelluläre Wasserleitfähigkeiten?

## 1.2 Welche Bedeutung haben die Aquaporine für das pflanzliche Streckungswachstum?

Seit den Pionierarbeiten von Wayne & Tazawa (1990) und Maurel et al. (1993) gilt als allgemeiner Konsens, dass Aquaporine die molekulare Basis für hohe Wasserleitfähigkeiten pflanzlicher Membranen sind (siehe oben). Eine Beteiligung von Aquaporinen an physiologischen Vorgängen, die mit einem sehr schnellen Austausch von Wasser über zelluläre Membranen einhergehen, konnte bisher jedoch nur in Einzelfällen nachgewiesen werden (Fleurat-Lessard et al., 1997; Sarda et al., 1997). Für die meisten der bisher identifizierten Aquaporine war eine derartige Eingrenzung ihrer physiologischen Funktion nicht bzw. nur ansatzweise möglich. Grundsätzlich wurde für pflanzliche Aquaporine postuliert, dass deren große genetische und funktionelle Diversität möglicherweise ein ebenso breites Spektrum an physiologischen Funktionen repräsentiert (Santoni et al., 2000). Die transiente Expression verschiedener *MIP* gerade in Geweben mit starker Zellexpansionsaktivität deutet eine funktionelle Beteiligung von Aquaporinen am Vorgang des pflanzlichen Volumenwachstums an. So korreliert beispielsweise die Expression von *AtTIP1-1*, einem funktionellen Aquaporin aus *Arabidopsis thaliana*, mit der Elongation der Wurzelspitze (Ludevid et al., 1992) und der Infloreszenzinternodien (Hanzawa et al., 1997). Das *AtPIP1-2* der gleichen Spezies ist ebenso besonders stark in expandierenden Zellen der Wurzel ausgeprägt (Kaldenhoff et al., 1995). Die Expression von *RsTIP1* aus *Raphanus sativa* korreliert mit der Elongationsaktivität des Hypokotyls (Higuchi et al., 1998). Darüber hinaus schafft die Kapazität pflanzlicher Membranen durch Aquaporine ihre Leitfähigkeit posttranslational zu verändern (Überblick in Johansson et al., 2000), möglicherweise eine molekulare Grundlage zur Regulation des Volumenwachstums pflanzlicher Zellen. Bis heute ist jedoch weitgehend ungeklärt, warum eine hohe Expression von Aquaporinen gerade während des Expansionswachstums pflanzlicher Zellen physiologisch relevant zu sein scheint (siehe oben).

Für die verwendete Modellpflanze *Ricinus communis* waren zu Beginn dieser Arbeit zwei *TIP*

identifiziert (Van de Loo et al., 1995). Im Rahmen von Vorarbeiten konnten mittels *RT-PCR* und degenerierten Primern Fragmente weiterer drei *TIP* und fünf *PIP* isoliert werden (Weig, unveröffentlicht). Darüber hinaus war bekannt, dass von den insgesamt zehn identifizierten *MIP*, die Vertreter *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* vorwiegend im Hypokotyl, insbesondere in der Elongationszone, exprimiert sind (Weig, unveröffentlicht). Daher lag der Fokus dieser Arbeit auf diesen drei *MIP*, bei welchen es sich um je einen Vertreter der größten *MIP*-Gruppen *PIP1*, *PIP2*, und *TIP1* handelte.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde nun anhand des beschriebenen Keimlingsmodells herausgearbeitet, inwieweit *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* als vermeintliche Aquaporine in die Regulation des Expansionswachstums pflanzlicher Zellen involviert sind. Dazu wurden folgende Fragestellungen experimentell bearbeitet:

- Welche besonderen Sequenzeigenschaften haben *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* mit bereits charakterisierten Aquaporinen gemeinsam?
- Codieren *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* für funktionelle Aquaporine?
- Korreliert die Expression von *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* mit der Elongationsaktivität entlang des Hypokotyls?
- Zeigen *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* in elongierendem Gewebe ein charakteristisches Expressionsmuster auf zellulärer Ebene?

### **1.3 Welche Bedeutung haben Zuckertransporter für das pflanzliche Streckungswachstum?**

Die treibende Kraft für die Aufnahme von Wasser in Pflanzenzellen ist ein Gradient des osmotischen Potentials über die Zellmembran und den Tonoplasten. Dieser Potentialgradient wird durch die aktive Aufnahme osmotisch aktiver Substanzen aufrechterhalten und determiniert letztendlich den Turgor einer Pflanzenzelle. Als Osmotika fungieren in pflanzlichen Zellen neben verschiedenen Ionen und organischen Säuren auch diverse Zucker. Für viele dieser Zucker sind spezifische Transportproteine aus der *major facilitator superfamily* (Marger & Saier, 1993) isoliert und charakterisiert worden (Überblick in: Delrot et al., 2000; Williams et al., 2000; Kuhn, 2003). Diese *Carrier* katalysieren im Symport mit Protonen die Aufnahme von Zuckermolekülen über die Membran und stellen somit neben den Aquaporinen eine weitere mögliche molekulare Grundlage für die Regulation des Expansionswachstums pflanzlicher Zellen dar. Auf molekularer Ebene konnte bisher nur das Elongationswachstum von Pollenschläuchen in direkten Zusammenhang mit der Expression von Saccharosetransportern gebracht werden (Lemoine et al., 1999; Stadler et al., 1999). In diesem speziellen Fall scheint die aktive Saccharoseaufnahme durch die Carrier maßgeblich am Aufbau eines osmotischen Gradienten als treibende Kraft für das Pollenschlauchwachstum beteiligt zu sein (Stadler et al., 1999).



Auf physiologischer Ebene zeigt eine Korrelation der Wachstumsrate und der Entladung von Saccharose aus dem Phloem eine mögliche Beteiligung aktiver Zuckercarrier am zellulären Volumenwachstum von Pflanzen an (Schmalstig & Cosgrove, 1990). Hinweise darauf liefern auch Befunde, die mit dem Hypokotyl von *Ricinus*-Keimlingen gemacht wurden. Hier findet in der Elongationszone eine verstärkte Entladung von Saccharose aus dem Phloem bzw. deren Aufnahme in die expandierenden Zellen sowie eine besonders starke Remobilisierung gespeicherter Stärke statt. Dabei steigt das osmotische Potential der Zellen innerhalb der Elongationszone sprunghaft an (Balane, 1997). Unter bestimmten Bedingungen (Salz- oder Wasserstress) konnte eine Limitierung des pflanzlichen Volumenwachstums durch die Verfügbarkeit von Osmotika nachgewiesen werden (Frensch, 1997; Fricke & Peters, 2002). Dies könnte ein Hinweis auf eine aktive Beteiligung von Zuckercarriern an der Regulation des Expansionswachstums pflanzlicher Zellen sein.

In dem verwendeten Pflanzenmodell *Ricinus communis* wurden bisher die zehn Hexosecarrier *RcHEX1* - *RcHEX10* (Weig et al., 1994) und die beiden Saccharosecarrier *RcSCR1* & *RcSCR2* identifiziert (Weig & Komor, 1996; Weig, unveröffentlicht). Die beiden Hexosecarrier *RcHEX3* und *RcHEX6* sowie der Saccharosecarrier *RcSCR1* wurden darüber hinaus funktionell charakterisiert (Weig, 1994; Weig & Komor, 1996). Eine starke relative Expression zeigt der Hexosecarrier *RcHEX1* im Hypokotyl des *Ricinus*-Keimlings (Weig et al., 1994). Hier sind auch die Hexosecarrier *RcHEX3* und *RcHEX6* ausgeprägt, deren stärkste relative Expression tritt jedoch in der Keimlingswurzel auf (Weig, 1994; Weig et al., 1994). Ebenso im Hypokotyl exprimiert ist der Saccharosecarrier *RcSCR1*, wobei über die relative Höhe dieser Expression, verglichen mit den anderen Keimlingsgeweben, unterschiedliche Befunde vorliegen (Weig & Komor, 1996; Bick et al., 1998). Der Saccharosecarrier *RcSCR2* scheint neben dem Hypokotyl auch stark im Endosperm etiolierter Keimlinge exprimiert zu sein (Weig, unveröffentlicht).

Vor diesem Hintergrund wurde nun anhand des *Ricinus*-Keimlingsmodells weiterführend herausgearbeitet, inwieweit die (putativen) Zuckercarrier *RcHEX1*, *RcHEX3* und *RcHEX6* sowie *RcSCR1* und *RcSCR2* in die Regulation von zellulärem Volumenwachstum involviert sind. Dazu wurden folgende Fragestellungen experimentell bearbeitet:

- Die Expression welcher Carrier korreliert mit der Elongationsaktivität entlang des Hypokotyls?
- Lassen sich über die zelluläre Verteilung eines Carriers (*RcSCR1*) Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion während des Expansionswachstums ziehen?
- Inwieweit korreliert das Auftreten von Speicherstärke mit der Expression von Zuckercarriern bzw. der Elongationsaktivität entlang des Hypokotyls?

## **1.4 Wie spielen molekulare Komponenten und biophysikalische Parameter während des pflanzlichen Streckungswachstums zusammen?**

Aus der Fülle von Befunden über den Vorgang pflanzlicher Zellexpansion zeichnet sich ab, dass mehrere biophysikalische Parameter und molekulare Komponenten in das Volumenwachstum höherer Pflanzen, bzw. dessen Regulation involviert sind. Eine elementare Bedeutung kommt dabei der passiven Aufnahme von Wasser, der plastischen Extension der Zellwand und der aktiven Aufnahme von Osmotika zu (Abb. 1). Als molekulare Bausteine dieser biophysikalischen Prozesse agieren in pflanzlichen Membranen u.a. die Aquaporine, die Expansine und verschiedene Ionen- und Zuckertransporter (siehe oben).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, innerhalb eines einzigen, standardisierten Modellorgans möglichst viele funktionelle Komponenten des Elongationswachstums zu erfassen, und Hinweise auf deren mögliche physiologische Verknüpfung zu erlangen.

Dabei lag der Schwerpunkt auf der molekularen Analyse von Aquaporinen als Komponente zellulärer Wasserleitfähigkeit, den Zuckercarriern als funktionelle Einheit des Transports gelöster Substanzen sowie den physiologischen Messungen der Parameter des Wasserhaushalts von Pflanzenzellen (osmotische und hydraulische Wasserleitfähigkeit, Turgor, elastischer Modul, Halbwertszeit von Turgorrelaxationen, Zellgrößenparameter). Die Befunde der molekularen Analysen sollten mit den physiologischen Daten verglichen, und korrelativ Hinweise auf ein mögliches funktionelles Zusammenspiel bei der Regulation des pflanzlichen Volumenwachstums herausgearbeitet werden. Dabei standen folgende Fragestellungen im Mittelpunkt:

- Sind die untersuchten Aquaporine eine molekulare Basis für die variable Wasserleitfähigkeit zellulärer Membranen bei der Regulation des Expansionswachstums?
- Findet während des Ablaufs der Elongation eine Ko-Regulierung von Aquaporinen, Zuckercarriern und des Stärkemetabolismus statt?
- Inwieweit korreliert die Expression von Aquaporinen und Zuckertransportern mit der räumlichen Ausprägung der Wasserhaushaltsparameter entlang des Hypokotyls?
- Welche physiologischen Funktionen unabhängig des zellulären Volumenwachstums kommen Aquaporinen zu?

## 1.5 Anmerkungen

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden die im Folgenden erläuterten Begrifflichkeiten angewendet.

### 1.5.1 Nomenklatur der *MIP*

Anhand des vollständigen Satz der 35 *MIP*-Gene aus *Arabidopsis thaliana* schlugen Johanson et al. (2001) eine einheitliche Nomenklatur für pflanzliche (*MIP*) vor. Die innerhalb dieser Arbeit verwendeten Gennamen orientieren sich an dieser Vorgabe. Ältere, teilweise sehr geläufige Benennungen werden jedoch beibehalten, es sei denn es erfolgte eine publizierte Umbenennung (wie im Falle der *Arabidopsis-MIP*). Im Übrigen wird die Nomenklatur der aktuellsten Veröffentlichung verwendet. Dadurch ist es möglich, das aufgeführte *MIP* anderer Arbeiten nicht nach ihrer phylogenetischen Zugehörigkeit benannt sind (z. B. *AcPIP1* [Cairney et al., 1995] ist nach Johanson et al. [2001] ein *PIP2*).

### 1.5.2 Begriff der "Expression"

In dieser Arbeit impliziert der Begriff der **Expression eines Gens** alle Schritte, von der genomischen DNA bis zur "...**Synthese eines funktionellen Proteins...**" (Freudig & Sauermost, 2001), inklusive Transkription und Translation und aller zwischengeschalteten regulatorischen Elemente. Der Begriff der **Ausprägung** bzw. des **Ausdrucks eines Gens** wird als Synonym für die Expression eines Gens verwendet. Als **Aktivität eines Gens** wird nur das Ausmaß der **Transkription** bezeichnet. Der Promotor ist ein Bestandteil des Gens, daher impliziert der Begriff der Genaktivität auch die **Aktivität des Promotors**. Der Begriff **Produkt eines Gens** wird gleichsam für mRNA und Protein verwendet, wobei erstere als **primäres** und letzteres als **sekundäres** Genprodukt bezeichnet wird (Freudig & Sauermost, 2001). Normalerweise sind die Menge der spezifischen **mRNA**, die Menge des spezifischen **Proteins** und das Ausmaß der spezifischen **Funktion** zueinander direkt proportional. Analysen auf der Basis einer dieser **Ebenen der Genexpression**, lassen demnach i. d. R. Aussagen über die Expression (und/oder Aktivität) des Gens zu und werden daher als **Expressionsanalysen** bezeichnet. Der Informationsgehalt dieser Analysen kann jedoch unterschiedlich sein, da regulatorische Elemente die Proportionalität der verschiedenen Ebenen verändern können. Gennamen werden daher im Zusammenhang mit den Begriffen der Genexpression bzw. der Genaktivität immer **kursiv** geschrieben, auch wenn beispielsweise auf der Ebene des Proteins analysiert wurde. Der Begriff der **Aktivität**, im Zusammenhang mit der **nicht-kursiv** geschriebenen Bezeichnung für Proteine, bezieht sich immer auf die **Funktion** des entsprechenden Proteins (z. B. "Die Lokalisierung der Expression von *RcPIP1-1* wurde auf Proteinebene durchgeführt.", "Die wasserleitende Aktivität von *RcPIP2-1* wurde in Membranen von *post-golgi* Vesikeln nachgewiesen.").

### 1.5.3 Verwendete Anglizismen

In der molekularbiologischen Literatur eingebürgerte Anglizismen werden unverändert in den Text dieser Arbeit übernommen, jedoch kursiv abgedruckt (z. B. *antisense*-Sonde).



---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Kultivierung und Ernte von *Ricinus*-Keimlingen

Samen von *Ricinus communis* L. 'Carmencita Rot' (Benary, Hannoversch Münden) wurden für ~14 Stunden (h) in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) bei 27 °C angequollen, in 0,3% Chinosol oberflächensterilisiert und viermal mit VE-Wasser gespült. Anschließend wurden die Samen für 2 Tage (d) bei 27 °C auf 2% Agar angekeimt. Die jungen Keimlinge wurden in Hydrokultur (0,5 M Kalziumchlorid [CaCl<sub>2</sub>], Belüftung), bei 27 °C, einer maximal möglichen relativen Luftfeuchte (~80%) in Dunkelheit für weitere drei Tage angezogen. Die ~6 ½ Tage alten Keimlinge wurden unter den gleichen Bedingungen für weitere 12-18 h im Dunkeln oder unter Belichtung (~200  $\mu\text{E}/\text{s}\cdot\text{m}^2$ ) gehalten. Damit waren die Keimlinge bei der Ernte bzw. während der durchgeführten Versuche immer 7-7,5 Tage alt (siehe Abb. 5, A, C). Lediglich zur quantitativen Analyse des Streckungswachstums (Kap. 3.1) wurden die Keimlinge für weitere 2 Tage unter gleichbleibenden Bedingungen wachsen gelassen. Die Charge der Licht-behandelten Keimlinge wurde dabei einem Hell/Dunkel-Rhythmus von 12 h unterworfen.

### 2.2 Analyse des Hypokotyl-Streckungswachstums

Zur Quantifizierung des Expansionswachstums wurde das Hypokotyl 6 Tage (d) alter Keimlinge in Abschnitte von 5 mm Länge unterteilt und die Abschnitte mit wasserfester Tinte markiert. Der Scheitelpunkt des Hypokotylhakens bildete dabei die Mitte eines dieser Segmente und wurde zusätzlich gekennzeichnet. Täglich wurden die Länge und der Durchmesser aller Segmente vermessen (für dunkel gehaltene Keimlinge unter photomorphogenetisch inaktivem Licht) und das jeweilige Volumen berechnet (näherungsweise zylindrisch). Daraus wurden für jeden Tag der relative Volumenzuwachs (als  $V/V_0$ , Abb. 6) und die relative Wachstumsrate berechnet (in  $\%/h$ , Kap. 3.1).

### 2.3 Schwellungstests mit Protoplasten und Vakuolen

Zur Durchführung der Schwellungstests wurden zunächst Protoplasten und Vakuolen in Anlehnung an Boller & Kende (1979), Damm & Willmitzer (1988) und Beck & Ziegler (1989) wie folgt isoliert:

Die geernteten Hypokotylsegmente wurden unter 0,5 M Mannitol, 5 M 2-(N-Morpholin)ethansulfonsäure (MES; pH 6,0), 1 M CaCl<sub>2</sub> in dünne Scheiben geschnitten (~0,5 mm). Danach wurde das Gewebe in obigem Inkubationsmedium bei pH 5,6 mit 2% Cellulysin™ Cellulase (Calbiochem®, Bad-Soden/Schwalbach) und 1% Macerace® Pectinase (Calbiochem®, Bad-Soden/Schwalbach) ~5-mal mit der Wasserstrahlpumpe infiltriert und für 6 h bei Raumtemperatur (RT) unter sehr leichtem Schütteln inkubiert. Dabei wurde die Freisetzung von Protoplasten aus dem Gewebeverband unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Anschließend wurde der Ansatz sukzessive durch Netze mit einer Maschenweite von 110  $\mu\text{m}$  und

60  $\mu\text{m}$  filtriert, das Gewebe mit enzymfreiem Inkubationsmedium gespült und das Filtrat bei 4°C gehalten. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 4°C und 70  $g$  wurde das Pellet in enzymfreiem Inkubationsmedium resuspendiert und erneut für 5 min bei 4°C und 50  $g$  zentrifugiert. Das entstandene Protoplasten-Pellet wurde in 0,5 M Saccharose, 20% Ficoll 400, 5 M MES (pH 6,0), 1 M  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert und mit 0,4 M Saccharose, 0,1 M Mannitol, 10% Ficoll 400, 5 M MES (pH 6,0), 1 M  $\text{CaCl}_2$  sowie enzymfreiem Inkubationsmedium überschichtet. Der entstandene Dichtegradient wurde für 10 min bei 4°C und 1000  $g$  zentrifugiert, die isolierten Protoplasten von der oberen Phasengrenze abgezogen und in 10-fachem Volumen enzymfreiem Inkubationsmedium aufgenommen. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 50  $g$  wurde das Protoplastenpellet erneut in enzymfreiem Inkubationsmedium aufgenommen. Diese Suspension stellte das Ausgangsmaterial für die Protoplasten-Schwellungstests dar.

Zur Isolation der Vakuolen wurden die Protoplasten in 0,35 M Mannitol, 10% Ficoll 400, 20 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 2 mM Dithiothreitol (DTT), 5 M N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES; pH 8,0), 0,17 ‰ Neutralrot aufgenommen und zur Lyse der Protoplasten leicht geschüttelt. Dabei wurde die Freisetzung von Vakuolen aus den Protoplasten unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die lysierten Protoplasten wurden mit 0,35 M Mannitol, 4% Ficoll 400, 20 M EDTA, 2 M DTT, 5 M HEPES (pH 7,7) sowie 0,45 M Mannitol, 10 M HEPES (pH 7,5), 1 M L-Cystein, 1 M 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (AEBSF) überschichtet. Der entstandene Dichtegradient wurde für 45 min bei 4°C und 4100  $g$  zentrifugiert, die isolierten Vakuolen von der oberen Phasengrenze abgezogen und in 10-fachem Volumen von 0,45 M Mannitol, 10 M HEPES (pH 7,5), 1 M L-Cystein, 1 M AEBSF aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 45 min bei 4°C und 4100  $g$  wurden die Vakuolen im zehnten Teil des Überstandes resuspendiert. Diese Suspension stellte das Ausgangsmaterial für die Vakuolen-Schwellungstests dar.

Zur Durchführung der Schwellungstests wurden definierte Mengen von destilliertem Wasser und der Protoplasten- bzw. Vakuolen-Suspension sukzessive in eine Pipettenspitze gesogen, unmittelbar danach auf einen Objektträger pipettiert und dabei vermischt. Die verwendeten elektronischen Pipetten (Research Pro, Eppendorf, Hamburg) erlauben im Modus 'Dilutieren' die sukzessive Aufnahme von zwei unterschiedlichen Flüssigkeiten, die durch eine kleine Luftblase getrennt sind. Eine Mischung der beiden Komponenten erfolgt erst bei der Abgabe aus der Pipettenspitze (im Folgenden werden Protoplasten und Vakuolen gleichermaßen als Protoplasten bezeichnet). Der dabei generierte, nach außen gerichtete osmotische Gradient ( $\Delta\Psi_\pi$ , 45-120 mOsm) löste die Schwellung der Protoplasten aus. Von einem fokussierten Protoplasten wurde mittels eines Lichtmikroskops (BH2, Olympus, Hamburg) mit angeschlossener Digitalkamera (DXC-101P, Sony®) eine Bildsequenz aufgenommen. Mittels einer Software für Bildbearbeitung (Image-Pro Plus®, 4.5.0.19, Media Cybernetics®, Gleichen) wurde für jedes Einzelbild die Protoplastengröße als Wert einer Kreisfläche dargestellt, und daraus eine Kinetik des protoplastischen Volumenwachstums generiert. Die Anfangssteigung dieser Kinetik wurde ermittelt und damit die osmotische Wasserpermeabili-

tät ( $P_f$ ) der beteiligten Membranen berechnet. Dazu wurde folgende Formel nach Ramahaleo et al. (1999) herangezogen:

$$P_f = \frac{dV}{dt} \times \frac{1}{S_0 \times V_w \times \Delta\Psi_\pi} \quad (\text{Gleichung 1})$$

$dV/dt$  stellt hierbei die Anfangsrate der Volumenänderung, und  $S_0$  die Anfangsoberfläche des Protoplasten dar.  $V_w$  steht für das molare Volumen von Wasser ( $0,018 \text{ l/mol}$ ) und  $\Delta\Psi_\pi$  für den auswärts gerichteten Gradienten des osmotischen Potentials.

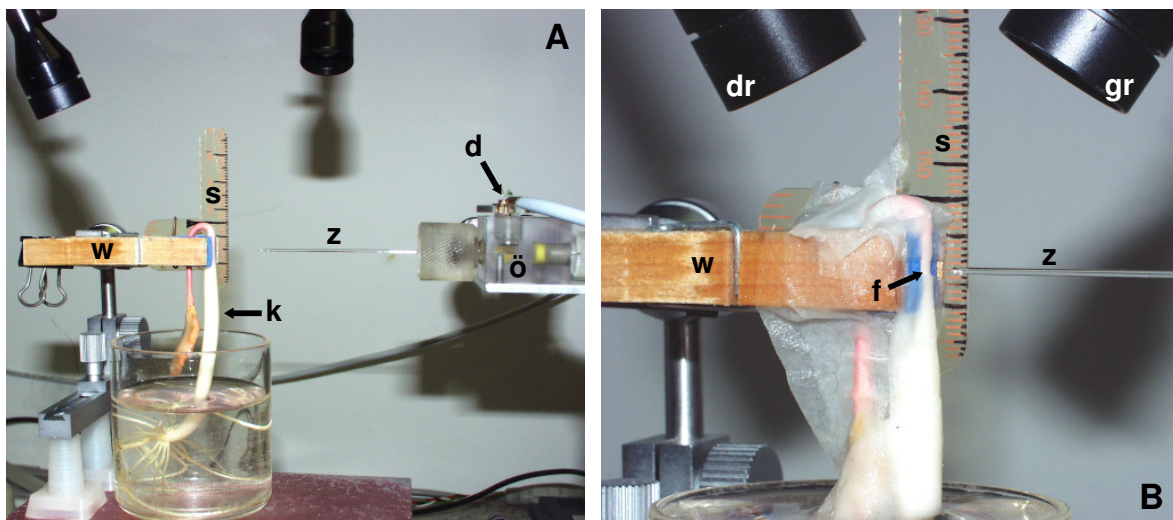
Zur Ermittlung der Sensitivität von  $P_f$  für Quecksilberionen wurden der Protoplastensuspension 5 min vor Testbeginn  $0,1 \text{ mM}$  Quecksilberchlorid zugegeben.

## 2.4 Messungen mit der Zelldrucksonde

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde eine Zelldrucksonde verwendet, wie sie von Hüsken et al. (1978) für Messungen von Zellen höherer Pflanzen modifiziert worden war. Als grundlegende Vorlage für die damit durchgeführten Messungen diente die Arbeit von Steudle (1993b). Eine detailliertere Beschreibung der Zelldrucksonden-Anwendung ist im Folgenden wiedergeben.

### 2.4.1 Bestimmung der Verteilung zellulärer Größenparameter

Zur Ermittlung von Volumen und Oberfläche von Kortexzellen in Abhängigkeit vom Abstand zur Hypokotyloberfläche, wurden zunächst Semi-Dünnschnitte ( $\sim 50 \text{ }\mu\text{m}$ ) der entsprechenden Hypokotylzonen in radialer und horizontaler Richtung angefertigt. Nach einer mikroskopischen Aufnahme wurden Durchmesser und Höhe sowie die jeweiligen Abstände kortikaler Zellen von der Hypokotyloberfläche (Tiefe) mit einer Software für Bildbearbeitung (siehe Kap. 2.3) ermittelt. Dabei wurden für jede untersuchte Hypokotylzone aus 3-4 Keimlingen insgesamt 450-600 Werte für Durchmesser und Höhe mit den zugehörigen Tiefen generiert. Der gesamte Kortex wurde in 15 Tiefenintervalle unterteilt (der untersuchte Bereich des Kortex umfasste ca. 15 Zellschichten). Die entsprechenden Werte jedes Tiefenintervalls wurden gemittelt. Aus den so erhaltenen Mittelwerten wurde das mittlere zelluläre Volumen für jedes Tiefenintervall berechnet. Dabei wurde für die Zellen des Kortex näherungsweise eine zylindrische Form angenommen. Außerdem wurden die Standardabweichungen des Zellvolumens für jedes Tiefenintervall nach dem entsprechenden Fehlerfortpflanzungsgesetz errechnet. Über die Daten der radialen Verteilung der Zellvolumina wurde eine Trendlinie montiert (Weibull, 5 Parameter). Mit dieser Hilfsfunktion wurde bei jeder Zelldrucksondenmessung der Endringtiefe, und somit dem Abstand der untersuchten Zelle von der Hypokotyloberfläche, ein absoluter Wert des entsprechenden Zellvolumens zugeordnet.



**Abb. 2: Versuchsanordnung für Messungen mit der Zelldrucksonde**

Die Versuchsanordnung ist im Aufbau (A) und während der Messungen gezeigt (B). Der Keimling (k) wurde mittels einer handelsüblichen Wäscheklammer (w) zwischen weichen Neoprenkissen (blau) in aufrechter Position genau am Bereich stärkster Elongation (~10 mm unterhalb des Hypokotylhakens) fixiert. Das Hypokotyl war für die Zelldrucksonde (z) mit Ölkammer (ö) und Druckwandler (d) von der Seite her frei zugänglich. Während der Messungen wurden die Wurzeln gewässert und der Keimling vollständig mit nassem Zellstoff bedeckt. Im Einstichbereich der Sonde wurde dabei ein kleines Fenster (f) ausgespart. Die vertikale Position der Sonde wurde mittels einer Skala (s) genau bestimmt. Während der Messungen an dunkel gehaltenen Keimlingen wurde über eine Kaltlichtquelle mit dunkelrotem (dr) und grünem Licht (gr) bestrahlt.

## 2.4.2 Versuchsaufbau der Zelldrucksondenmessungen

Der Versuchsaufbau für die Zelldrucksondenmessungen ist in Abb. 2 beschrieben. Die Keimlinge wurden nach Entnahme aus den Anzuchtschalen möglichst zügig fixiert, gewässert und mit nassem Zellstoff bedeckt. Während der Messungen wurde die Apparatur mit einer Kaltlichtquelle ausgeleuchtet (KL 1500, Schott, Mainz). Für Messungen an belichteten Keimlingen wurde bei vollständig geöffneter Blende (Stufe 5) und höchster Lichtstärke illuminiert, für Messungen an dunkel gehaltenen Keimlingen wurde bei kleinster Blende (Stufe 1) und niedrigster Lichtstärke ausgeleuchtet. Im letzteren Fall wurden zusätzlich Adapter mit einem grünen (D 525/50, AF Analysentechnik, Tübingen) und dunkelrotem Lichtfilter (RG 715, Schott, Mainz) benutzt. Die Dauer der Untersuchung wurde pro Keimling auf ~90 min begrenzt. Alle Messungen fanden bei Raumtemperatur (RT) statt. Die Sonde und die Ölkammer waren mit Silikonöl gefüllt (Siliconöl AS 4, Wacker-Chemie, München). Die verwendeten Kapillaren (Borosilicatglas/klar 310, Hilgenberg, Malsfeld) hatten einen Außendurchmesser von 1 mm und einen Innendurchmesser von 0,58 mm. Die Sondenspitze wurde bei einer Stromstärke von 16,5 Ampere in einer speziellen Apparatur gezogen (L/M-3P-A, List-Medical Electronic, Darmstadt) und hatte nach einem Anschliff einen Durchmesser von 5-10 µm. Um die Eindringtiefe der Kapillare für jede Messung ermitteln zu können, wurde mit wasserfester Tinte, ~1 mm hinter der Spitze, eine Markierung angebracht. Der Abstand dieser Markierung von



der Sondenspitze wurde über eine Skala im Okular des verwendeten Stereomikroskops (Wild M8, Leica Mikrosysteme, Bensheim) ausgemessen. Die Übertragung der Signale des Druckwandlers zum Computer, erfolgte über ein Sensor-Interface (Typ 92101, Burster Präzisionsmesstechnik, Gernsbach) mit entsprechender Software (ICP 100, Version 2.90). Die Aufzeichnung und Auswertung der gemessenen Druckkinetiken wurde mit einer speziell entwickelten Software durchgeführt (pfloek, Version 1.06, LS Pflanzenökologie, Universität Bayreuth).

### 2.4.3 Ablauf der Zelldrucksondenmessungen

Durchgeführt wurden die Messungen mit der Zelldrucksonde auf der Außenseite des Hypokotyls, relativ zur Krümmung des Hypokotylhakens gesehen. Nach Anstechen der äußeren Zellschichten wurde i. d. R. Zellsaft in die Kapillare gedrückt, so dass unter dem Stereomikroskop ein Meniskus an der Grenzfläche zum Silikonöl sichtbar wurde. Der Meniskus wurde durch die elektrische Volumenjustierung der Zelldrucksonde an einer Position 'gehalten', die einen Druck von 0,5 - 1,0 MPa zur Folge hatte. Aus dieser Konstellation heraus wurden sukzessive weiter innenliegende Zellen sondiert und die entsprechenden Druckkinetiken aufgenommen. Es wurde versucht sicherzustellen, dass sich der Meniskus vor und nach der Sondierung einer Zelle, sowie über den gesamten Messzeitraum dieser Zelle, an derselben Position in der Kapillare befand. Die erfolgreiche Sondierung einer Zelle wurde an einer schnellen Bewegung des Meniskus Richtung Sondeninnerem erkannt und der Meniskus auf seine vorherige Ausgangsposition 'zurückbewegt'. Dabei zeigte die 'freie Bewegbarkeit des Meniskus' an, dass keine Verstopfung der Kapillare vorlag. Nachdem sich der gemessene Druck auf ein stabiles Niveau eingestellt hatte (Turgor der Zelle), wurden für jede Zelle durch definierte Volumenänderungen mehrere Druckrelaxationskinetiken und Druckpeaks aufgenommen. Nach Beendigung der Messungen an einem Keimling (max. 90 min), wurde die Sonde aus dem Gewebe herausgezogen und oberhalb der Neoprenfixierung (Abb. 2) in die äußeren Zellschichten platziert. Anhand der Aufbiegung der Kapillare wurde so qualitativ nachgewiesen, dass noch Streckungswachstum des Hypokotyls stattfand.

### 2.4.4 Berechnungen der biophysikalischen Parameter des zellulären Wasserhaushalts

Zur Berechnung der hydraulischen Leitfähigkeit ( $L_p$ ) einer Zelle wurde über die Druckrelaxationskinetik eine einfach-exponentielle Funktion montiert und die Halbwertszeit ( $T_{1/2}$ ) ermittelt. Außerdem wurde das Niveau des Druckplateaus nach vollständiger Druckrelaxation als Wert für den zellulären Turgor ( $P$ ) angenommen. Weiterhin wurde aus der Höhe des Druckpeaks ( $\Delta P$ ), der zugehörigen Volumenänderung ( $\Delta V$ ) und dem absoluten Volumen der sondierten Zelle ( $V$ , siehe Kap. 2.4.1) der elastische Modul ( $\varepsilon$ ) nach Hüsken et al. (1978) anhand folgender Formel ermittelt:

$$\varepsilon = \frac{V \times \Delta P}{\Delta V} \quad (\text{Gleichung 2})$$

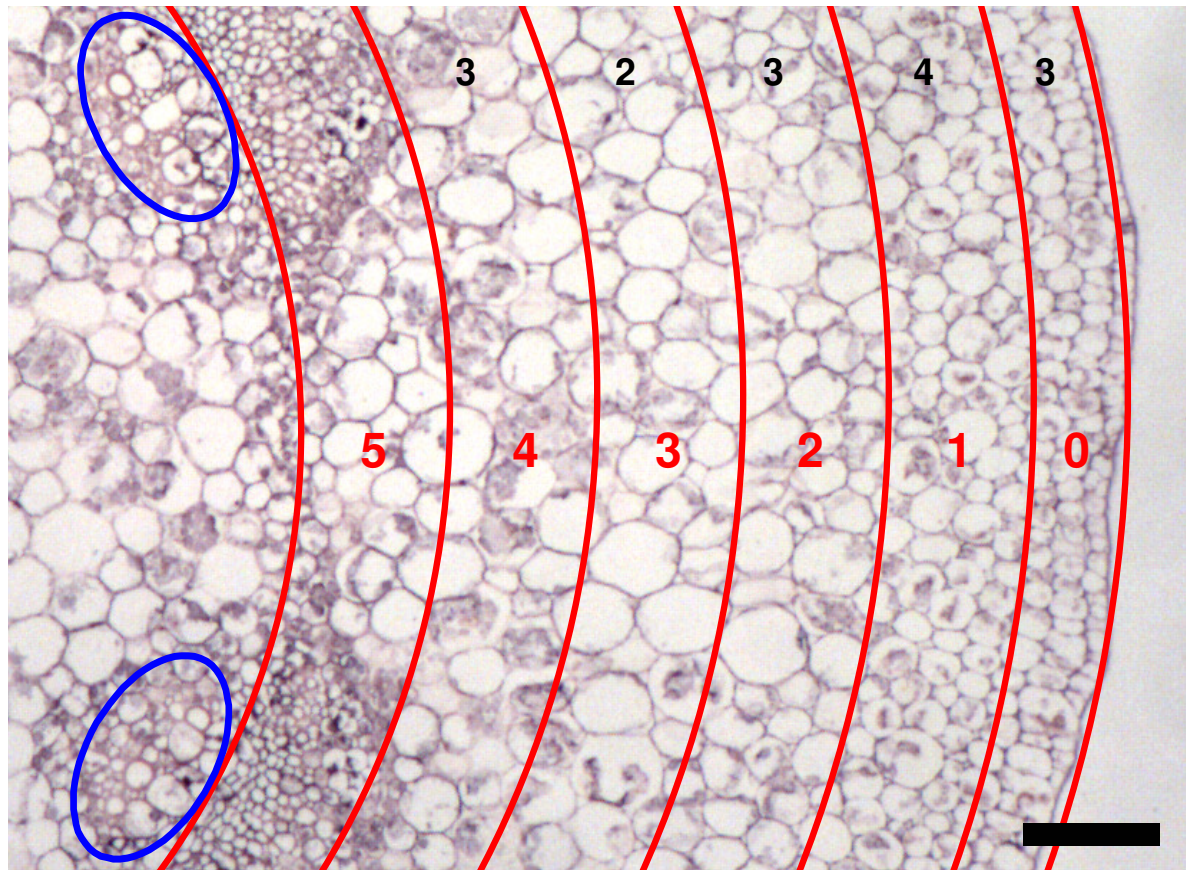
Aus diesen Daten und der Oberfläche ( $A$ ) der sondierten Zelle (siehe Kap. 2.4.1), wurde die hydraulische Leitfähigkeit ( $L_p$ ) der untersuchten Zelle wiederum nach Hüsken et al. (1978) und nachstehender Formel berechnet:

$$L_p = \frac{V \times \ln 2}{A \times T_{1/2} \times (\xi + \Psi_{\pi i})} \quad (\text{Gleichung 3})$$

Dabei wurde angenommen, dass der Betrag des osmotischen Potentials des Zellsaftes  $\Psi_{\pi i}$  den Betrag von  $P$  widerspiegelt (gilt für die Annahme, dass das  $\Psi_{\pi}$  des Apoplasten gleich Null ist). Alle Werte die aus der Auswertung mehrerer Druckkinetiken bzw. Druckpeaks derselben Zelle hervorgingen, wurden gemittelt. Darüber hinaus wurde der Kortex in radialer Richtung in 6 Tiefenintervalle unterteilt (Abb. 3). Aus den gemittelten Werten aller Zellen der Tiefenintervalle wurde wiederum der Mittelwert gebildet. Somit basieren die gezeigten Befunde (Kap. 3.3) auf gemittelte Werte von 1-15 Zellen pro Tiefenintervall, wobei vorher die Werte jeder einzelnen Zelle aus der Auswertung von 1-7 Druckrelaxationskinetiken bzw. Druckpeaks gemittelt worden waren.

Zur Berechnung von radialen Wasserpotentialgradienten ( $\Delta\Psi$ ) wurde der Hypokotylkortex (Tiefenintervalle 0-4) in radialer Richtung zunächst in 15 Röhren unterteilt (Abb. 3). Jede dieser Röhren repräsentiert dabei in guter Näherung eine Zellschicht des Kortex (innerhalb der Tiefenintervalle 0-4 liegen in radialer Richtung ~15 Zellen [Abb. 3]). Die Mantelfläche dieser Röhren stellt nach Molz & Boyer (1978) die 'effektive Querschnittsfläche' dar, welche rechtwinklig zum radialen Wasserfluss angeordnet ist. Für diesen Wasserfluss von den leitenden Geweben innerhalb des Kortex nach außen, bildet jede dieser Röhren eine Barriere, die zwei Membransysteme repräsentiert: Das erste Membransystem wird durchtreten, wenn Wasser aus der innerhalb liegenden Zellschicht in den Apoplasten fließt, das zweite, wenn Wasser aus dem Apoplasten in die außerhalb liegende Zellschicht eintritt. Daher durchtritt Wachstumswasser, das radial über den gesamten Kortex fließt, insgesamt ~30 einzelne Membranbarrieren. Anhand der ermittelten Wachstumsrate (Kap. 3.1) und der bekannten Geometrie der Zellschichten (Abb. 3), wurde das entsprechende Wasservolumen berechnet, das durch jede dieser Membranbarrieren hindurchtritt, um außerhalb liegendes Gewebe mit 'Wachstumswasser' zu versorgen. Dabei wurde angenommen, dass der Wasserfluss über die Membranbarriere zu 95% dem Volumenzuwachs des Gewebes entspricht (pflanzliches Gewebe besteht bis zu 95% aus Wasser [Sitte et al., 1991]). Da die  $L_p$  kortikaler Zellmembranen durch die Messungen mit der Zelldrucksonde bekannt war (Abb. 11), konnte für jede einzelne Membranbarriere näherungsweise der korrespondierende Wasserpotentialgradient berechnet werden. Dabei wurden, aufgrund fehlender Daten für die (sub-)epidermalen Zellschichten (Tiefenintervall 0), die gleichen hydraulischen Leitfähigkeiten angenommen, wie sie in Tiefenintervall 1 vorherrschten. Die Summe der berechneten Einzelgradienten ergab schließlich den Wasserpotentialgradient über den gesamten Kortex (Tiefenintervalle 0-4). Dabei wurde berücksichtigt, dass sich jedes Tiefenintervall mit bekannter  $L_p$  aus unterschiedlich vielen Zellschichten zusammensetzt (Abb. 3). Die innersten kortikalen

Zellschichten (Tiefenintervall 5) wurden bei der Berechnung aus zwei Gründen nicht berücksichtigt. Zum einen lagen für dieses Intervall sehr wenige Daten vor (Kap. 3.3). Zum anderen war aufgrund der Heterogenität der Zellgrößen in diesem Bereich (siehe Abb. 3) eine sichere Ermittlung der Zellübergänge nicht möglich.



**Abb. 3: Schematische Aufteilung des Hypokotylkortex von *Ricinus* in radialer Richtung**

Die Aufteilung des Kortex in die Tiefenintervalle 0-5 ist schematisch wiedergegeben (rot). Außer dem Tiefenintervall 0 sind alle Tiefenintervalle 150 µm stark (schwarzer Balken). Markiert sind auch die Bereiche des Xylems als 'source des Wachstumswassers' (blau). Die gemittelte Anzahl an Zellübergängen ist für jedes Tiefenintervall am oberen Rand angegeben (schwarz). Für die Berechnung des Wasserpotentialgradienten repräsentiert jeder Zellübergang zwei röhrenförmige Membranbarrieren, die senkrecht zum radialen Wasserfluss angeordnet sind. Im Hintergrund ist eine lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch die Elongationszone des Hypokotyls nach der Behandlung mit spezifischem *RcTIP1-1*-Antiserum gezeigt (Kap. 3.6.2.3).

Der Berechnung des Wasserpotentialgradienten einer einzelner Membranbarriere lag folgende Gleichung zugrunde (Cosgrove, 1981):

$$\frac{dV}{V \times dt} = L(\sigma \times \Delta\pi - P) \quad (\text{Gleichung 4})$$

Der linke Quotient der Gleichung gibt die relative Wachstumsrate wieder.  $\sigma$  steht für den Reflexionskoeffizienten des Osmotikums,  $\Delta\pi$  für den Gradienten des osmotischen Potentials über eine Membran und  $P$  für den zellulären Turgor.  $L$  ist der mittlere hydraulische Leitwert und repräsentiert im Prinzip die  $L_p$  einer Membranbarriere unter Einbezug der geometrischen Parameter nach folgender Beziehung (Cosgrove, 1981):

$$L = \frac{L_p \times A}{V} \quad (\text{Gleichung 5})$$

$A$  steht für die Fläche der Membranbarriere ('effektive Querschnittsfläche' nach Molz & Boyer (1978) und  $V$  für das entsprechende Volumen der außerhalb liegenden 'Kortexröhre'. Da angenommen wird, dass der Reflexionskoeffizient idealerweise gleich 1 ist (Membranen sind dann ideal semipermeabel) und der Term  $\Delta\pi - P$  den Wasserpotentialgradienten über eine Membran beschreibt, lässt sich Gleichung 4 auch formulieren als:

$$\frac{dV}{V \times dt} = L \times \Delta\psi \quad (\text{Gleichung 6})$$

Diese Gleichung stellt im Prinzip den von Boyer, (1985) formulierten Zusammenhang zwischen Wasserfluss  $J$ , hydraulischer Leitfähigkeit  $L_p$  und einem Gradienten des Wasserpotentials  $\Delta\psi$  über eine Membranbarriere dar:

$$J = L_p \times \Delta\psi \quad (\text{Gleichung 7})$$

Aus der Summe der einzelnen  $\Delta\psi$  über alle 30 Membranbarrieren, durch die radial fließendes Wachstumswasser hindurchtritt, wurde der Wasserpotentialgradient über den gesamten Kortex ( $\Delta\psi_c$ ) berechnet. Der korrespondierende mittlere hydraulische Leitwert  $L_c$  wurde aus dem erhaltenen Wasserpotentialgradienten nach Gleichung 6 berechnet. Die volumetrische Extensibilität des Kortexgewebes  $m_c$  wurde mit folgender Formel ermittelt (Lockhart, 1965):

$$\frac{dV}{V \times dt} = m_c \times (P_c - Y_c) \quad (\text{Gleichung 8})$$

Dabei repräsentiert der linke Term wiederum den relativen Volumenzuwachs,  $P_c$  den mittleren zellulären Turgor des gesamten Kortex und  $Y_c$  den korrespondierenden *yield threshold*. Dieser auch als kritischer Turgor beschriebene Parameter gibt den minimalen Wert von  $P$  an, der gegenüber dem Widerstand der plastisch verformbaren Zellwand gerade (nicht) zu einer Expansion der Zelle führt. In Ermangelung eigener Daten wurde für den Term  $(P_c - Y_c)$  ein Wert eingesetzt, der für stark elongierendes Hypokotyl der Augenbohne ermittelt wurde (Okamoto et al., 1990).

Zum Vergleich von Werten von  $L_p$  und  $P_f$  wurde folgender Zusammenhang dieser beiden Parameter zugrundegelegt (siehe auch Maurel, 1997):

$$P_f = \frac{L_p \times R \times T}{V_w} \quad (\text{Gleichung 9})$$

Dabei ist  $R$  die allgemeine Gaskonstante ( $8,314 \text{ J/mol}^\circ\text{K}$ ),  $T$  die absolute Temperatur und  $V_w$  das molare Volumen von Wasser (siehe Kap. 2.3).

## 2.5 Isolierung vollständiger cDNA-Klone

### 2.5.1 cDNA-Bank screening

Zur Isolation der vollständigen Klone der untersuchten *MIP*, wurde eine cDNA-Bank aus dem Hypokotyl eines 6 d alten *Ricinus*-Keimlings verwendet, deren *inserts* am 3'-Ende von einer *Not* I- und am 5'-Ende von einer *Eco*R I-Schnittstelle flankiert wurden (Schobert & Komor, unveröffentlicht).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte das *screening* dieser cDNA-Bank durch Filter-Hybridisierungen nach Benton & Davis (1977) und den Modifikationen von Weig (1994). Als Wirtszellen dienten dabei *Escherichia coli* des Stammes NM522 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die verwendeten Sonden wurden über *polymerase chain reaction* (PCR, Roche Diagnostics, Mannheim) mit Digoxigenin-markierten Nukleotiden hergestellt (Digoxigenin-11-dUTP, Roche Diagnostics, Mannheim). Als *template* dienten Plasmide mit dem Vektor pBluescript® KS (+) (Stratagene® Europe, Amsterdam, Niederlande) als *backbone* und mit cDNA-Fragmenten der untersuchten *MIP* als *insert* (Weig, unveröffentlicht, Tab. I). Als Primer wurden DNA-Oligonukleotide gegen die *T3*- und *T7*-Promotorregion des Vektors verwendet.

**Tab. I: Plasmide als *template* zur Herstellung Digoxigenin-markierter cDNA-Sonden**

Plasmid <sup>1</sup> :	<i>MIP</i> <sup>2</sup> :	Fragment <sup>3</sup> :
pRP5-9	<i>PIP1-1</i>	3'-Ende
pRP2-1	<i>PIP2-1</i>	3'-Ende
pT4-7	<i>TIP1-1</i>	Vollängen-cDNA

Gelistet sind die Bezeichnungen der Plasmide (<sup>1</sup>), der Genname der untersuchten *MIP* (<sup>2</sup>) und der Bereich, über den sich die Sequenz der Sonden erstreckt (<sup>3</sup>).

### 2.5.2 Klonierung und Identifikation vollständiger cDNA-Klone

Die identifizierten Phagenklone des cDNA-Bank-*screenings* wurden aus Plattenlysaten isoliert und gereinigt (Weig, 1994). Über die Restriktionsschnittstellen *Not* I und *EcoR* I wurden die cDNA-*inserts* in die MCS des Vektors pBluescript® II KS (+) umklont. Die vollständige Sequenz der cDNA-Inserts wurde ermittelt (GATC Biotech, Konstanz) und identifiziert (Kap. 3.4.2.1 & 7).

## 2.6 Heterologe Expression der cDNA-Klone in Hefe

Zur heterologen Expression der isolierten cDNA in Hefezellen, wurde zunächst deren vollständige cDNA über die Restriktionsschnittstellen *Xho* I und *Not* I aus den Isolationsklonen (Kap. 2.5) in die MCS des Hefeexpressionsvektors pDR195 (Rentsch et al., 1995) umklont. Die erhaltenen Plasmide wurden nach Gietz et al. (1992) in den Stamm NY17 von *Saccharomyces cerevisiae* (Walworth & Novick, 1987) transformiert. Die Selektion erfolgte durch Komplementation der *ura3*-Mutation dieses Stammes mittels des verwendeten Expressionsvektors. Der Nachweis der spezifischen, primären Genprodukte der untersuchten *MIP*, wurde durch *northern*-Hybridisierungen von isolierter *RNA* der Hefeklone mit spezifischen, DIG-markierten *RNA*-Sonden geführt (Kap. 2.9.4). Die Sonden wurden, wie in Kap. 2.9.3 beschrieben, durch *in vitro*-Transkription synthetisiert. Als Vorlage dienten die Isolationsklone des *screenings* der cDNA-Bank, so dass die generierten Sonden die vollständige, codierende Sequenz der untersuchten *MIP* repräsentierten. Der Nachweis der spezifischen, sekundären Genprodukte, erfolgte durch *westernblots* mit Membranprotein von isolierten *post-golgi* Vesikel der jeweiligen Hefeklone (Kap. 2.7) und spezifischem Antiserum (Kap. 2.10).

## 2.7 Stopped-flow Spektroskopie an *post-golgi* Vesikeln

Die *stopped-flow* Spektroskopie von isolierten *post-golgi* Vesikeln zur funktionellen Charakterisierung der untersuchten *MIP* wurde nach Laize et al. (1995) durchgeführt. Zur Isolation der Vesikel erfolgte die Anzucht der Hefeklone in 500 ml MMA-Medium; die Induktion des Promotors in Galaktose-Medium entfiel.

Die Größenbestimmung der Vesikel erfolgte sowohl durch die Auswertung von Abbildungen elektronenmikroskopischer Präparate als auch durch Messung der dynamischen Lichtstreuung (DLS) der entsprechenden Vesikelsuspensionen.

Im ersten Fall wurden, mit freundlicher Unterstützung des Lehrstuhls für Physikalische Chemie I der Universität Bayreuth, elektronenmikroskopische Aufnahmen der Vesikelsuspensionen gemacht. Die Präparation erfolgte dabei mittels Gefrierbruchtechnik (siehe auch Hoffmann, 2004). Dazu wurden Aliquote von Vesikelsuspension in flüssiges Propan eingeschossen, unter Hochvakuum bei Temperaturen <-100°C gebrochen, und die Bruchfläche geätzt und bedampft (BAF 400 *Freeze Etching System*, Balzers, Bingen-Kempton). Die Bildgebung erfolgte über ein Transmissionselektronenmikroskop mit einer Beschleunigungsspannung von 80 kV (CEM 902, Zeiss, Oberkochen). Die Vermessung der Vesikel erfolgte

wie in Kap. 2.3 beschrieben. Es wurden die gemittelten Durchmesser für alle Vesikel der jeweiligen Hefeklone ermittelt. Darüber hinaus wurden die Vesikel in Populationen unterteilt, die Vesikel mit Unterschieden im Durchmesser von 10 nm repräsentierten. Für jede dieser Populationen wurde wiederum ein mittlerer Durchmesser berechnet. Aus diesen Daten wurde der hydrodynamische Radius  $r_h$  nach folgender Gleichung berechnet (Chu, 1991):

$$r_h = \sqrt[4]{\frac{\sum n_i \times r_i^4}{\sum n_i}} \quad (\text{Gleichung 10})$$

Dabei ist  $n_i$  die Anzahl der Vesikel pro Größenpopulation und  $r_i$  der entsprechende mittlere Radius.

Die Messungen der dynamischen Lichtstreuung wurden ebenso am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Universität Bayreuth nach Chu (1991) durchgeführt. Dazu wurde die Vesikelsuspension ~5 fach in Resuspensionspuffer verdünnt (Laize et al., 1995). Die dynamische Lichtstreuung wurde mittels eines Helium/Neon-Lasers der Wellenlänge 632,8 nm (BI-200 SM goniometer, Brookhaven Instruments, Holtsville, USA), einem Streuwinkel von 90 ° bei RT aufgenommen. Aus den generierten Daten wurde ebenso der hydrodynamische Radius  $r_h$  der Vesikel berechnet.

Die *stopped-flow* Spektroskopie wurde mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schmid (Laboratorium für Biochemie der Universität Bayreuth) durchgeführt. Dazu wurde die Vesikelsuspension nach Laize et al. (1995) auf 0,1 mg/ml Proteingehalt verdünnt und in einer *stopped-flow* Apparatur (DX17MV, Applied Photophysics, Leatherhead, UK) mit dem gleichen Volumen an hyperosmotischer Mannitollösung gemischt. Der resultierende, einwärts gerichtete Gradient des osmotischen Potentials  $\Delta\Psi_\pi$  lag in den verschiedenen Messungen zwischen 80 und 250 mOsm. Detektiert wurden Kinetiken der Intensität von um 90 ° gestreuten Lichts, bei einer Wellenlänge von 437 nm, während eines Zeitfensters von 0,5 - 1 s, bei einer Datenaufnahme von 1-2 Hz. Sowohl der Mischvorgang als auch die Messungen fanden unter einem Druck von 0,2 - 0,4 MPa statt. Zur Auswertung wurden 7-14 einzelne Zeitkinetiken gemittelt, und über die resultierende Kinetik eine doppelt-exponentielle Funktion montiert. Aus den Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der schnellen und langsamen Teilkinetiken dieser Funktion wurde analog zu Laize et al. (1995) die osmotische Wasserpermeabilität  $P_f$  nach folgender Gleichung berechnet:

$$P_f = \frac{k \times V_0}{S_0 \times V_w \times \Delta\Psi_\pi} \quad (\text{Gleichung 11})$$

Dabei steht  $V_0$  für das Volumen,  $S_0$  für die Oberfläche der isolierten Vesikel.  $V_w$  für das molare Volumen von Wasser und  $\Delta\Psi_\pi$  für den Gradient des osmotischen Potentials über die Vesikelmembran. Zur Ermittlung der Aktivierungsenergie des transmembranen Wasserflusses wurden *stopped-flow* Messungen in einem Temperaturspektrum von 10-30 °C durchgeführt.

Die Aktivierungsenergie  $E_a$  wurde aus einer Auftragung des natürlichen Logarithmus von  $k$  gegen den Kehrwert der absoluten Temperatur und der Arrhenius-Gleichung ermittelt:

$$E_a = -m \times R \quad (\text{Gleichung 12})$$

Dabei repräsentiert  $m$  die Steigung einer linearen Regression durch die aufgetragenen Daten und  $R$  die allgemeine Gaskonstante.

## 2.8 Messungen des osmotischen Potentials

In der vorliegenden Arbeit wurde das osmotische Potential von Lösungen mittels eines Gefrierpunkt-Osmometers gemessen (Osmomat 030, Gonotec, Berlin). Eine derartige Messung wurde für alle Versuche durchgeführt, in denen das osmotische Potential von Lösungen eine maßgebliche Rolle spielte (Kap. 2.3, 2.4 & 2.7).

## 2.9 Identifizierung und Lokalisierung spezifischer Transkripte

Alle Arbeiten mit *RNA* wurden unter *RNAse*-freien Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden Glaswaren für >3 h bei 180 °C gebacken. Plastikmaterial wurde entweder durch dreistündige Inkubation in Chloroform oder Natronlauge (0,1 M) *RNAse*-frei gemacht. Die verwendeten Chemikalien waren *RNAse*-frei. Wasser wurde durch Inkubation mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, 1 µl/ml) und anschließender Autoklavierung *RNAse*-frei gemacht. Einwegmaterialien (Pipettenspitzen, Objektträger usw.) wurden in *RNAse*-freier Qualität bezogen.

### 2.9.1 RNA-Isolierung

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Isolation von Gesamt-*RNA* (*gRNA*) zwei verschiedene Methoden angewandt. Zum einen wurde *RNA* analog zu Hoffman & Winston, 1987) und modifiziert nach Weig (1994) extrahiert. Alternativ dazu wurde *RNA* mit dem Hybaid RiboLyser™-System isoliert (Hybaid RiboLyser™ Kit *Green*, Thermo Hybaid, Franklin, USA). Dabei wurde genau nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Zur Isolation von *gRNA* aus *Ricinus*-Hypokotyl wurden ~250 mg Gewebe pro Isolationsansatz eingesetzt. Das Ausgangsmaterial zur *gRNA*-Extraktion aus Hefezellen waren je 150 µl eines Zellpellets, als Resultat einer Zentrifugation der Hefesuspensionen für 5 min bei RT und 15.000 *g*.

### 2.9.2 Semiquantitative RT-PCR

Für die semiquantitative *RT-PCR* wurde sowohl die reverse Transkription als auch die *PCR*-Amplifikation analog zu Weig et al. (1997) durchgeführt. Als entsprechende Enzyme dienten die *Superscript II*™ *Reverse Transcriptase* (Gibco-BRL, Karlsruhe), bzw. die *Taq*-Polymerase (PerkinElmer Life Sciences, Rodgau-Jügesheim). Als Primer bei der cDNA-Synthese wurden Nukleotid-Hexamere zufälliger Sequenz eingesetzt (*Random Primers*, GibcoBRL, Karlsruhe). Die bei der *PCR* verwendeten, spezifischen Primerpaare (MWG Biotech AG, Ebersberg) sind mit ihrer Nukleotidsequenz und der entsprechenden Schmelztemperatur in Tab. II angegeben.



ben. Pro *PCR*-Lauf wurden 25 Amplifikationszyklen durchgeführt (DNA Thermal Cycler, PerkinElmer Life Sciences, Rodgau-Jügesheim). Die amplifizierte DNA wurde elektrophoretisch in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt, in das  $2 \cdot 10^{-5}\%$  Ethidiumbromid einpolymerisiert waren. Die Fluoreszenzsignale der DNA-Banden unter ultraviolettem Licht (UV, 312 nm) wurden digital aufgenommen (ImageMaster® VDS, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und deren relative Intensität mit einer entsprechenden Software quantifiziert (ImageMaster® 1D Software). Als interne Kontrolle wurde zusätzlich 18 S-*RNA* amplifiziert, und die Signale der anderen Gene darauf normiert.

**Tab. II: Primerpaare, die zur Amplifikation spezifischer cDNA verwendet wurden**

Zielgen:	Bezeichnung:	Sequenz:	$T_a$ :	$T_m$ :
<i>PIP1-1</i>	RcAQPP2F1	5'-AGGATTGAAGGTAGTCATG-3'	60	53,2
	RcAQPP2R1	5'-GGCTGCACCGAGACTACG-3'		61,0
<i>PIP2-1</i>	RcAQPP5F1	5'-ACTGATTAGGGCTGTAGCT-3'	60	54,5
	RcAQPP5R1	5'-AGTACCAGTGATGGGGATT-3'		54,5
<i>TIP1-1</i>	RcAQPT4F1	5'-GGCGGTAACATCACTCTTC-3'	60	56,7
	RcAQPT4R1	5'-GGTCAGCTGGAGCTGGGAAA-3'		61,4
<i>SCR1</i>	RSCR1	5'-AAGTGCAGGGGTGGTGAG-3'	64	58,0
	RSCR2	5'-GTCAAGGCAGGTGCATTG-3'		56,0
<i>SCR2</i>	RcSCR2F1	5'-AACCCTCTCTCTTAACACC-3'	58	56,0
	RcSCR2R2	5'-GAGAAGAAATGGAAACCAG-3'		54,0
<i>HEX1</i>	RCA4	5'-CTCAGCTGTGACTGGAGCAG-3'	64	61,4
	RCA1	5'-TATGGAAGGGGGGCTAC-3'		50,2
<i>HEX3</i>	RCC2	5'-TTGCCACAATGGTATGCAGT-3'	64	55,3
	RCC1	5'-TGCTGCTAATCCCAAAGG-3'		62,3
<i>HEX6</i>	RCF3	5'-TGGGGGTGTACAGATGTTTG-3'	64	57,3
	RCF1	5'-CAAACGCAGGGAAAGTG-3'		54,9
<i>18S-RNA</i>	18SF2	5'-TCAAAGCAAGCCTACGCTC-3'	52	56,7
	18SR1	5'-TGTTACGACTTCTCCTTC-3'		52,0

Die Schmelztemperatur jedes Primers ist angegeben ( $T_m$ ); außerdem die verwendete annealing-Temperatur ( $T_a$ ).

### 2.9.3 Erstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Digoxigenin markierte *RNA*-Sonden wurden mittels *T3*- bzw. *T7*-*RNA*-Polymerasen und Digoxigenin-11-*UTP* durch *in vitro*-Transkription generiert. Dabei wurde ein kommerzielles Markierungssystem verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen (DIG *RNA* Labeling KIT, Roche Diagnostics, Mannheim). Für jedes zu analysierende Transkript wurden sowohl *sense*- als auch *antisense*-Sonden synthetisiert. Als Vorlage dienten die Isolationsplasmide der untersuchten *MIP* bzw. Plasmide mit Fragmenten der *MIP* als Inserts

(Kap. 2.5.2, Weig, unveröffentlicht), welche vorher durch geeignete Restriktionen linearisiert worden waren (Tab. III). Die vergleichbare Konzentration von *sense*- und *antisense*-Sonden wurde durch Quantifizierung der Ethidiumbromid-Fluoreszenz im Agarosegel überprüft (Kap. 2.9.2). Die Quantifizierung der Sondenmarkierung erfolgte durch Detektion von Farbsignalen auf einer Nylonmembran mittels eines kommerziellen Digoxigenin-Quantifizierungssystems (DIG Quantifikation/Control Teststrips, Roche Diagnostics, Mannheim). Auf der Basis dieser Tests wurde die Menge bzw. das Mengenverhältnis der zur Hybridisierung eingesetzten *sense*- und *antisense*-Sonden gewählt.

**Tab. III: Digoxigenin-markierte *RNA*-Sonden zur Detektion spezifischer *mRNA***

Zielgen:	Plasmid:	Orientierung:	Bereich:	Länge:	Schnittstelle:
<i>RcPIP1-1</i>	pP2L	<i>sense</i>	Volllänge	1180 bp	<i>Not</i> I
		<i>antisense</i>	Volllänge	1154 bp	<i>EcoR</i> I
<i>RcPIP2-1</i>	pP5L	<i>sense</i>	Volllänge	1298 bp	<i>Not</i> I
		<i>antisense</i>	Volllänge	1272 bp	<i>EcoR</i> I
	pRP5-9	<i>sense</i>	3'-Ende mit <i>NTR</i>	666 bp*	<i>Cla</i> I
		<i>antisense</i>	3'-Ende mit <i>NTR</i>	664 bp*	<i>BamH</i> I
<i>RcPIP1-1</i>	pT4L	<i>sense</i>	Volllänge	1148 bp	<i>Not</i> I
		<i>antisense</i>	Volllänge	1122 bp	<i>EcoR</i> I

Die Sonden für die *in situ*-Hybridisierung wurden durch saure Hydrolyse auf eine Länge von ~150 bp gebracht (\*)

Für die *in situ*-Hybridisierungen wurde die Länge der entsprechenden Sonden durch Hydrolyse auf ~150 bp reduziert und die Sonden anschließend gereinigt (nach Deblock & Debrouwer, 1993). Für die *northernblots* wurden die ungekürzten Sonden verwendet.

## 2.9.4 Detektion von immobilisierter *RNA* (*northern-blot*)

Für *northern*-Analysen wurde *gRNA*, wie in Kap. 2.9.1 beschrieben, nach dem Hybaid RiboLyser™-System isoliert und für jedes untersuchte Gewebe 9 µg *gRNA* nach Sambrook & Russel (2001) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Beendigung des Elektrophoreseschrittes, wurde die *RNA* auf positiv geladene Nylonmembranen (Biodyne B, Pall Filtron Corp., Northborough, USA) übertragen (nach Sambrook & Russel, 2001) und daran durch UV-Bestrahlung (254 nm) für 5 min mit anschliessendem Backen für 45 min bei 70 °C fixiert. Als interne Kontrolle wurden die Fluoreszenzsignale der Banden der 25 S- und 18 S-rRNA auf der *blot*-Membran, wie in Kap. 2.9.2 aufgenommen und quantifiziert. Die Hybridisierung mit den spezifischen Sonden (Kap. 2.9.3) wurde mittels eines kommerziellen Systems zum Nachweis von Digoxigenin-markierten Nukleinsäuren durchgeführt (DIG Nucleic Acid Detection Kit, Roche Diagnostics, Mannheim). Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Es wurden 0,5 µg Digoxigenin-markierte Sonde pro ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Die hybridisierten Membranen wurden zweimal für 20 min unter sehr stringenten

Bedingungen gewaschen (0,05% SSC, 0,1% SDS, 66 °C). Die Detektion der gebundenen Sonden erfolgte ebenso nach oben angegebenem System (alkalische Phosphatase [AP] mit NBT/BCIP als Substrat). Die Konzentration des Anti-Dig-AP-Konjugats (Roche Diagnostics, Mannheim) betrug dabei 1:2000. Farbsignale wurden mittels eines Scanners (ScanJet 6100C/T, Hewlett Packard, Böblingen) aufgenommen, ihre Intensität wie in Kap. 2.9.2 quantifiziert und auf die Signalstärke der zugehörigen Kontroll-rRNA normiert.

### 2.9.5 *In situ*-Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung wurde im Prinzip nach Jackson (1991) mit folgenden Modifikationen von Long (2002) durchgeführt. Nach Deblock & Debrouwer (1993) wurde Hypokotylgewebe unter Fixierungslösung (Formalin-Essigsäure) in 1-2 mm dicke Stücke geschnitten, fixiert und gewaschen. Anschließend wurden die Gewebestücke für jeweils 1 h in Ethanol mit zunehmender Konzentration inkubiert (50%, 60%, 70%, 85%). Nach einer Inkubation in 95%-igem Ethanol mit 0,1% Eosin (Sigma, Taufkirchen) wurde das Gewebe 2 mal für 30 min in 100% Ethanol mit, und 2 mal für 60 min in 100%-igen Ethanol ohne 0,1% Eosin inkubiert. Nachfolgend wurde das Ethanol sukzessive durch Tissue-Clear® (Sakura, Giessen) ersetzt, indem das Gewebe jeweils 30 min in steigender Tissue-Clear®-Konzentration (25%, 50%, 75%) inkubiert wurde. Nach 2 weiteren Inkubationen in 100%-igem Tissue-Clear® für 1 h, wurde ¼ des Volumens an Paraplast-Pellets (Paraplast X-tra, Sigma, Taufkirchen) hinzugefügt und bei RT für ~16 h stehen gelassen. Anschließend wurde das Paraplast bei 42°C geschmolzen, nochmals ¼ des Volumens an Paraplast-Pellets hinzugefügt, und die Temperatur auf 58°C erhöht. Nach einer weiteren Inkubation von ~4 h wurde das Gewebe 2 mal pro Tag, über einen Zeitraum von 3 Tagen, in frisches, geschmolzenes Paraplast überführt und bei gleichbleibend 58°C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Gewebestücke in spezielle Paraffin-Einbettformen (Leica Microsystems, Nußloch) platziert, mit flüssigem Paraplast überlagert, an Jet-Kassetten (Leica Microsystems, Nußloch) fixiert und erkalten gelassen.

Dünnschnitte wurden mittels eines elektrischen Mikrotoms (2050, Reichert-Jung, Leica Microsystems, Nußloch) angefertigt. Die Schnittdicke betrug 8 µm. Frische Schnittserien wurden auf Wasser bei 42°C gespreitet, auf positiv geladene Objektträger (SuperFrost®Plus, Menzel-Gläser®, Braunschweig) übertragen und für 16-20 h bei 42°C getrocknet.

Zur Hybridisierung wurden die Schnitte nach Deblock & Debrouwer (1993) vorbehandelt. Im Unterschied dazu dauerte die Proteinase K-Behandlung 15 min und wurde durch eine Inkubation für 2 min in PBS mit 0,2% Glycin abgeschlossen. Zur Acetylierung wurde 100 M Triethanolamin mit 0,5% Essigsäure-Anhydrid verrührt, und die Schnitte für 10 min bei RT darin inkubiert. Danach wurden die Schnitte wie bei Jackson (1991) dehydriert und an der Luft getrocknet.

Die Hybridisierung, nachfolgende Waschschrte und die RNase-Behandlung wurden nach Deblock & Debrouwer (1993) durchgeführt. Die Zusammensetzung der Hybridisierungslösung entsprach genau dieser Vorlage. Der eigentlichen Hybridisierung ging eine Prähybridisierung mit Hybridisierungslösung ohne markierte Sonden voraus. Für die Hybridisierung wurden 1,6 µg markierte Sonde pro ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Die abschließende

Waschung der Schnitte erfolgte unter mäßig stringenten Bedingungen (0,2% SSC, 0,1% SDS, 57 °C).

Die Detektion der gebundenen Sonden erfolgte ebenso nach Deblock & Debrouwer (1993) mittels des in Kap. 2.9.4 beschriebenen Systems. Die Konzentration des Anti-Dig-AP-Konjugats betrug dabei 1:2000. Zusätzlich wurde der Färbelösung 0,1 M Levamisol beige-mischt und der Polyvinylalkohol weggelassen. Nach vollendeter Färbung wurden die Schnitte für jeweils 10 s in 75 %, 100% und wieder 75% technischen Alkohol getaucht und anschließend in Wasser überführt. Die Einbettung der Schnitte erfolgte in einem speziellen Medium auf wässriger Basis (Aquatex<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt). Mikroskopische Abbildungen wurden wie in Kap. 2.3 generiert.

## 2.10 Identifizierung und Lokalisierung spezifischer Proteine

Zur Identifizierung und Lokalisierung von Proteinen wurden spezifische Antikörper erzeugt. Dazu wurden synthetische Peptide hergestellt, welche nicht-konservierte, immunogene Epitope der Proteine repräsentieren. Die Peptide wurden in Kaninchen injiziert und deren Blutseren nach ~100 Tagen gewonnen. Eine Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten Antisera, der zugehörigen Epitope und der Bezugsquellen zeigt Tab. IV.

**Tab. IV: Peptide, gegen die spezifische Antikörper synthetisiert wurden**

Zielprotein:	synthetisches Peptid:	Proteinabschnitt:
<sup>1</sup> RcPIP1-1	NH <sub>2</sub> - <b>GFEGSHDYTRLGG</b> -CONH <sub>2</sub>	extrazelluläre Schleife C
<sup>2</sup> RcPIP2-1	NH <sub>2</sub> - <b>VGEETQTSHGKCG</b> -CONH <sub>2</sub>	N-Terminus
<sup>2</sup> RcTIP1-1	NH <sub>2</sub> - <b>RNIAVGHPHEATQPDALK</b> -CONH <sub>2</sub>	N-Terminus
<sup>2</sup> RcSCR1	NH <sub>2</sub> - <b>MQSSTSKENKQPPSSQPHC</b> -CONH <sub>2</sub>	N-Terminus

Die Proteinepitope, welche als Vorlage zur Peptidsynthese dienten, sind fettgedruckt. Peptide und Antisera wurden über Eurogentec<sup>1</sup> (Searing, Belgien) und Pineda Antikörper-Service<sup>2</sup> (Berlin) bezogen.

Rohseren wurden gegen die zugehörigen Peptide oder gegen Protein A affinitätsgereinigt. Im ersten Fall wurde 0,1 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in 1 M Salzsäure (HCl) aktiviert und mit 2 mg Peptid in 0,1 M Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) (pH 8,3), 0,5 M Natriumchlorid (NaCl) unter Bewegung für 2 h bei RT inkubiert. Die Matrix wurde mit 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,3), 0,5 M NaCl gewaschen und unter Bewegung für ~16 h bei 4°C in 0,1 M Tris Pufferan<sup>®</sup> (Tris)/HCl (pH 8,0) inkubiert. Anschließend wurde die Matrix sukzessive mit 0,1 M Natriumacetat (NaOAc, pH 4,0), 0,5 M NaCl und 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0), 0,5 M NaCl gewaschen. Dieser Waschschrift wurden 3 mal wiederholt. Nach einer Äquilibration in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) wurde die Matrix mit 1 ml Rohserum in 9 ml PBS unter Bewegung für ~16 h bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS und einer Äquilibration mit 0,5 M NaCl wurden gebundene Antikörper mit 50 M Glycin (pH 1,9) eluiert und sofort mit  $\frac{1}{10}$  des Eluatvolumens an 1 M Tris/HCl

(pH 8,0) vermengt. Zur Lagerung der Antikörper wurde 1% Rinderserumalbumin (BSA) zugegeben.

Im zweiten Fall wurde zunächst 0,1 g Protein A Sepharose CL4B (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) gequollen und mehrmals mit frischem Puffer gewaschen. Anschließend wurden 250 µl von Rohserum in 10-facher Menge an oben genanntem Puffer für ½ h mit der gequollenen Sepharose unter Bewegung bei RT inkubiert. Nach einer Waschung der Matrix mit Puffer wurden das gebundene Immunglobulin G mit 2 ml 0,1 M Zitronensäure eluiert und sofort mit 300 µl 1 M NaOH und 100 µl 1 M Tris/HCl (pH 7,5) vermengt. Zur Lagerung der Antikörper wurde 1% Rinderserumalbumin (BSA) zugegeben.

Die Funktion aller verwendeten Antikörper wurde im *western blot* (Kap. 2.10.2) überprüft, ebenso die Spezifität des Signals, indem Antikörper im Voraus mit dem zugehörigen Peptid abgesättigt wurden (Kap. 2.10.2).

### 2.10.1 Extraktion von Membranprotein

Membranprotein wurde aus Mikrosomen extrahiert. Zur Isolation von Mikrosomen wurde Hypokotylgewebe in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Gewebepulver mit der 4-fachen Menge an Aufschlusspuffer (12% Saccharose, 50 M Tris/HCl [pH 7,5], 1 M EDTA, 2 M Aminoethyl Benzensulfonyl Fluorid Hydrochlorid [AEBSF], 4 µg/ml Aprotinin, 200 µg/ml Leupeptin) durch Schütteln für ½ h mit Glasperlen bei 4°C homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat für 10 min bei 4°C und 13.000 g und der erhaltene Überstand weiterführend für 60 min bei 4°C und 100.000 g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in Extraktionspuffer (50 M Tris/HCl [pH 8,25], 50 M Tricin, 0,05% Laurylsulfat [SDS], 6,5 M [DTT], 0,6 M Benzamidin, 0,6 M Phenylmethylsulfonylfluorid [PMSF], 0,5 6-Aminocapronsäure, 0,5 M EDTA, 0,5 M Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)-Tetraessigsäure [EGTA]) resuspendiert und bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels eines kommerziellen Tests nach Bradford (1976, Protein Assay, Bio-Rad, München), welcher nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Als Mengenstandard diente dabei BSA. Für Untersuchungen von Membranprotein aus Hefe wurden isolierte *post-golgi* Vesikel (Kap. 2.7) herangezogen.

### 2.10.2 Immunodetektion von immobilisierten Proteinen (*western-blot*)

Die Immunodetektion von immobilisierten Proteinen erfolgte im Prinzip nach Towbin et al. (1979). Dazu wurde zunächst eine Polyakrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Schagger & Jagow (1987) durchgeführt. Die Solubilisierung von Proteinen erfolgte dabei in 20 M Tris/HCl (pH 6,8), 8,3% Glycerin, 1% SDS, 0,3% β-Mercaptoethanol, 0,2 % Bromphenolblau für 15 min bei 65 °C. Der Lauf der Polyakrylamid-Gele wurde in einer kommerziellen Gelapparatur (Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell, Bio-Rad, München) nach Sambrook & Russel (2001) durchgeführt. Zur Ermittlung des Molekulargewichts der Proteine diente ein kommerzieller Proteinstandard (MultiMark™, Invitrogen, Groningen). Die Färbung der Polyakrylamid-Gele mit Coomassie Brilliant Blue R-250 erfolgte ebenso nach Sambrook & Russel (2001).

Abbildungen von Polyakrylamid-Gelen wurden wie in Kap. 2.9.4 unter Verwendung einer Durchlichteinheit aufgenommen.

Nach Towbin et al. (1979) wurden die Proteine elektrophoretisch auf Polyvinylidenfluorid-Membranen (PVDF, Immobilon P, Millipore, München) transferiert und immunologisch detektiert. Die spezifischen Antiseren wurden dabei 1:500 verdünnt eingesetzt. Als sekundärer Antikörper diente an alkalische Phosphatase gekoppeltes, monoklonales Anti-Kaninchen Immunoglobulin (Klon RG-16, Sigma, Taufkirchen) in einer Verdünnung von 1:2000. Die Detektion der AP-Aktivität und die Aufnahme von Abbildungen erfolgte wie in Kap. 2.9.4 beschrieben.

### 2.10.3 Immunolokalisierung

Zur Immunolokalisierung wurde die Fixierung, die Einbettung und das Anfertigen der Schnittpräparate von Hypokotylgewebe wie in Kap. 2.9.5 durchgeführt. Die Schnittpräparate wurden nach Jackson (1991) mit Tissue-Clear<sup>®</sup> entwacht und letzteres durch zweimaliges Waschen in 100% Ethanol für jeweils 2 min entfernt. Anschließend wurde das Gewebe durch Inkubation für jeweils 1 min in Ethanol mit abnehmender Konzentration (95%, 85%, 70%, 50%, 30%) rehydriert. Nach einer Waschung in PBS für 2 min wurden die Schnitte für 45 min in PBS, 1% Magermilchpulver inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe im gleichen Puffer für 1½ h mit den primären Antikörpern behandelt. Die dabei gewählten Verdünnungen sind aus Tab. V ersichtlich. Nach dreimaliger Waschung für jeweils 15 min in PBS, 1% Magermilchpulver, 0,1% Triton X-100 wurde das Gewebe erneut in PBS, 1% Magermilchpulver äquilibriert. Anschließend wurde es im gleichen Puffer für 1 h mit dem sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 behandelt (siehe Kap. 2.10.2). Nach dreimaliger Waschung für jeweils 15 min in PBS, 1% Magermilchpulver, 0,1% Triton X-100 erfolgte die Detektion der AP-Aktivität sowie die Aufnahme von Abbildungen wie in Kap. 2.10.2. Die Färbedauer der jeweiligen Lokalisierungsexperimente ist Tab. V zu entnehmen.

**Tab. V: Versuchsbedingungen bei der Lokalisierung spezifischer Proteine**

Protein:	Verdünnung:	Aufreinigung:	Färbedauer:	Methode:
PIP1-1	1:100	Protein A	½ h	IML
TIP1-1	1:5000	spezif. Peptid	1 h	IML
SCR1	1:3000	spezif. Peptid	~5 h	IML

Angegeben ist die Bezeichnung der Proteine, die Verdünnung und Aufreinigungsmethode des primären Antikörpers, die Färbedauer während der AP-Detektion sowie die angewandte Lokalisierungsmethode (Immunolokalisierung [IML]).

Zur Anfärbung von Kallose wurden Dünnschnitte für 10 min in 1 mM Natriumphosphat-puffer [pH 7,5], 0,01% Anilinblau getaucht und anschließend 2 mal für 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Unter UV-Licht (Lichtquelle: VHW 50f-2b, Zeiss, Oberkochen) wurde gleichzeitig die Fluoreszenz der Kallose als auch die Autofluoreszenz lignifizierter Zellwände angeregt und mikroskopische Abbildungen wie in Kap. 2.3 aufgenommen (Mikroskop: STANDARD 18

mit Fluoreszenz-Auflichtkondensor IV FI; Filter: BP 400-440, FT 460, Lp 470; Zeiss, Oberkochen).

Zur Anfärbung von Stärke wurden Dünnschnitte für 1 min in Lugolsche Lösung getaucht, anschließend für ~10 min in destilliertem Wasser gewaschen und Abbildungen wie in Kap. 2.3 aufgenommen.

## 2.11 Grundlegende molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Basismethoden wurden standardmäßig nach Sambrook & Russel (2001) durchgeführt.

Restriktionsenzyme und die entsprechenden Puffersysteme wurden bei Fermentas (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs® (Frankfurt-Höchst) bezogen, die jeweiligen Bedingungen der Restriktionsverdau nach den Herstellerangaben gewählt. Ligationen wurden mit einer T4 DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden Kulturen des Stammes DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983) und NM522 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) von *Escherichia coli* sowie Kulturen des Stammes NY17 (*a*, *ura 3-52*, *sec 6-4*; Walworth & Novick, 1987) von *Saccharomyces cerevisiae* benutzt. Die Transformation von *Escherichia coli* wurde nach Sambrook & Russel (2001) durchgeführt. Die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte nach Gietz et al. (1992). Reine Plasmidlösungen wurden mittels eines kommerziellen Systems (Nucleobond AX, Macherey-Nagel, Düren) erhalten. Die Elution von DNA wurde mittels eines kommerziellen Kits (Agarose Gel DNA Extraktion Kit, Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt.

## 2.12 Bezugsquellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von Sigma (Taufkirchen) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Mikrobiologische Medienzusätze stammten von GibcoBRL (Karlsruhe). Oligonukleotidprimer wurden bei MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen. Spezielle Bezugsquellen sind in den jeweiligen Abschnitten angegeben.

## 2.13 Software und Statistik

Analysen von DNA- und Proteinsequenzen erfolgten mittels der Software GCG Wisconsin Package (Version 10.3, Accelrys, San Diego, USA). *Alignments* wurden mit ClustalX (Version 1.81, Thompson et al., 1997) generiert. Datenbankrecherchen wurden am National Center for Biotechnology Information (2003, NCBI, BLAST) durchgeführt.

Spezielle Software ist in den jeweiligen Abschnitten angegeben. Statistische Analysen wurden in Anlehnung an Lamprecht (1999) mit den Programmen SigmaStat® (Version 2.03, SPSS, Chicago, USA), SPSS (Version 10.0.7, SPSS®, Chicago, USA) oder WinSTAT® (R. Fitch Software, Staufen) durchgeführt.





## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Elongation des *Ricinus*-Hypokotyls wird durch endogene Faktoren reguliert und durch Licht inhibiert

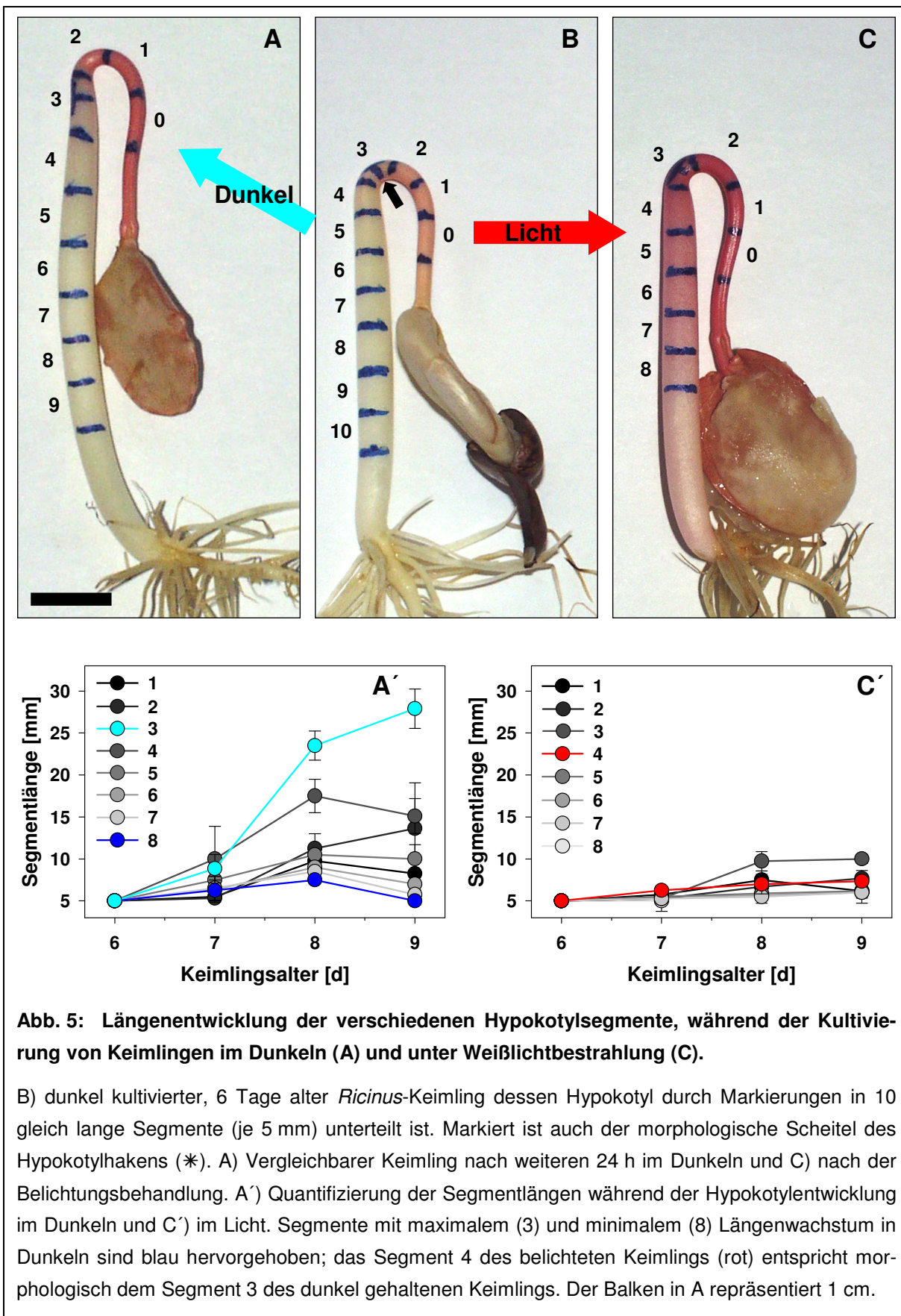
Das Hypokotyl eines sechs bis sieben Tage alten, im Dunkeln gewachsenen *Ricinus*-Keimlings zeigt die Aufteilung in Zellteilungszone, Hypokotylhaken, Zellstreckungszone und Zone ausdifferenzierter Zellen (Abb. 4, A). Für die vorliegende Arbeit wurde das Elongationswachstum der Hypokotylachse unter standardisierten Bedingungen quantitativ analysiert. Dazu wurden Keimlinge entlang ihres Hypokotyls markiert (Abb. 5, B) und die axiale Lage (relativ zum morphologischen Scheitelpunkt des Hypokotylhakens) sowie das Längenwachstum der einzelnen Abschnitte über einen Zeitraum von drei Tagen im Dunkeln und unter Belichtung bestimmt (Abb. 5, A', C').



**Abb. 4: *Ricinus*-Keimlinge mit etioliertem Hypokotyl**

B) 6 Tage alte, dunkel gehaltene *Ricinus*-Keimlinge in hydroponischer Kultur. A) Hypokotyl eines einzelnen Keimlings (♣) mit charakteristischer Aufteilung: Zellteilungszone (T), Hypokotylhaken (HH), Elongationszone (E) und ausdifferenziertes Hypokotyl (R).

Bei dunkel gehaltenen Keimlingen hat das Segment 3 den größten Längenzuwachs, der im Zeitrahmen von Tag 7-8 bei einem Abstand von  $\sim 10$  mm vom Hypokotylhaken sein Maximum erreicht ( $15,2 \text{ mm}/\text{Tag}$ ). Das geringste Längenwachstum vollziehen in diesem Zeitraum die basalen Segmente wenige Zentimeter oberhalb des Wurzelhalses (z. B. Segment 8 mit  $\sim 1,3 \text{ mm}/\text{Tag}$ ; Abb. 5, A'). Bei belichteten Keimlingen ist der Längenzuwachs des Segments 3 vergleichsweise niedrig. Hier ist Segment 4 in obigem Zeitfenster  $\sim 10$  mm vom Hypokotylhaken entfernt und entspricht morphologisch dem Segment 3 dunkel gehaltener Keimlinge.

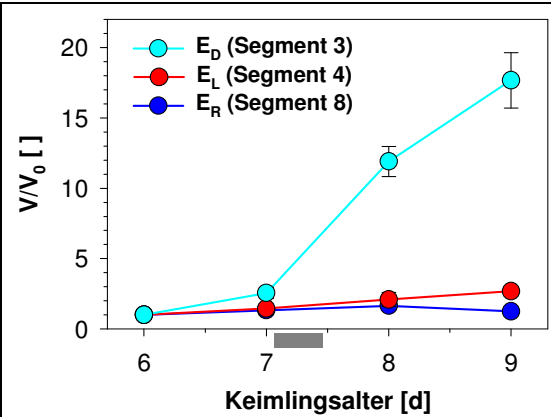


Segment 4 vollführt noch rudimentäres Längenwachstum von  $\sim 1 \text{ mm/Tag}$  (Abb. 5, C'). Die Streckungsraten des apikalen Hypokotyls sind bei belichteten und dunkel gehaltenen Keimlingen vergleichbar gering.

Aus Länge und Durchmesser der Segmente 3 und 8 von dunkel gehaltenen sowie Segment 4 von belichteten Keimlingen, wurde das Volumen berechnet und die relative Volumenzunahme bestimmt (Abb. 6). Daraus geht bei dunkel gehaltenen Keimlingen eine maximale Wachstumsrate von  $15,2\%/h$  im Segment 3 während des Tages 7-8 hervor. Die Wachstumsrate des entsprechenden Segments 4 bei belichteten Keimlingen ist um das 5,7-fache auf  $2,7\%/h$  reduziert. In dunkel gehaltenen Keimlingen ist die Wachstumsrate im basalen Segment 8 nur  $\sim 1,3\%/h$  und somit 11,4-fach geringer als in Segment 3.

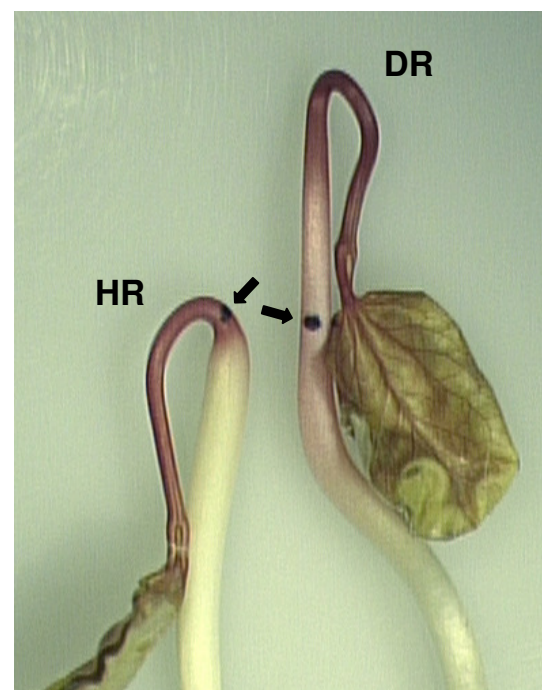
Auf der Basis dieser Wachstumsanalysen, wurden für alle Untersuchungen der vorliegenden Arbeit Keimlinge im Alter von 7-7,5 Tage nach Quellung der Samen gewählt (Abb. 5, A, C). Innerhalb dieses Zeitfensters wurden die verschiedenen Zonen des Hypokotyls wie folgt definiert: Für dunkel gehaltene Keimlinge (Abb. 5, A, A) repräsentiert das Segment 0 die Zellteilungszone, das Segment 3 die Elongationszone und die Segmente 7-9 das reife Hypokotyl. Innerhalb der Elongationszone ist der Bereich des stärksten Volumenzuwachses  $\sim 10$  mm vom Hypokotylhaken entfernt. Analog dazu repräsentieren für belichtete Keimlinge die Segmente 0 & 1 die Zellteilungszone und die Segmente 7-8 das reife Hypokotyl (Abb. 5, C). Das der Elongationszone dunkel gehaltener Keimlinge entsprechende Gewebe ist hier das Segment 4 und wird als 'Elongationszone' belichteter Keimlinge bezeichnet.

Nach Mohr & Ziegler (1969) wird die Photomorphogenese eines Keimlings vornehmlich durch das pflanzliche Phytochromsystem gesteuert. Um diesen Zusammenhang auch für das Streckungswachstum des *Ricinus*-Hypokotyls nachzuweisen, wurden zwei Keimlinge am Apex des Hypokotylhakens markiert,



**Abb. 6:** Relative Volumenzunahme in der Elongationszone ( $E_D$ ) und dem reifen Hypokotyl ( $E_R$ ) dunkel gehaltener, sowie der in der 'Elongationszone' belichteter Keimlinge ( $E_L$ ).

Das Zeitfenster, in dem alle vorliegenden Untersuchungen stattfanden, ist an der Abszisse grau hervorgehoben.



**Abb. 7:** Einfluss der Lichtqualität auf die Ausbildung einer Elongationszone.

Gezeigt sind 7 Tage alte Keimlinge nach Behandlung mit hell- (HR, 660 nm) bzw. dunkelrotem Licht (DR, 720 nm) für 24 h. Die Farbmarken zeigen die Lage des Apex vor der Behandlung an (Pfeile).

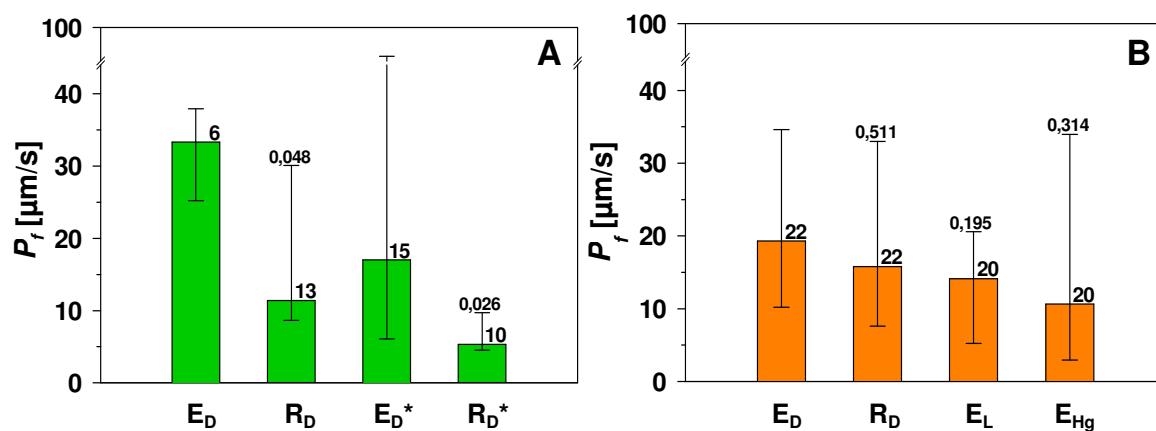


und die Elongationsaktivität nach Bestrahlung mit hellrotem (660 nm) und dunkelrotem Licht (730 nm) qualitativ analysiert.

Vergleichbar mit dunkel gehaltenen Keimlingen ist unter Einfluss dunkelroten Lichts die Streckungsaktivität der Elongationszone sehr hoch. Bestrahlung mit hellrotem Licht dagegen inhibiert die Elongation nahezu vollständig (Abb. 7).

### 3.2 Die osmotische Wasserpermeabilität zellulärer Membranen wird entlang der Hypokotylachse reguliert

Der durch den hydraulischen Widerstand zellulärer Membranen eingeschränkte Wasserfluss in bzw. durch elongierende Zellen könnte ein Faktor sein, der das Streckungswachstum des Hypokotyls limitiert. Daher wurde untersucht, inwieweit in Hypokotylgewebe die Veränderung der Zellstreckungsaktivität in axialer Richtung zusammen mit einer Regulation der osmotischen Wasserpermeabilität ( $P_f$ ) zellulärer Membranen einhergeht. Dazu wurden aus stark elongierendem Gewebe und Geweben ohne nennenswerte Elongationsaktivität Vakuolen und Protoplasten isoliert (Kap. 2.3) und durch Aufnahme von Schwellungskinetiken in hypotonischem Medium die  $P_f$  der jeweiligen Membranen ermittelt (Abb. 8). Hierbei lieferte die Untersuchung von Vakuolen die  $P_f$  des Tonoplasten. Die  $P_f$ , die aus den Schwellungskinetiken von Protoplasten berechnet wurde, impliziert dagegen die  $P_f$  der Plasmamembran, der

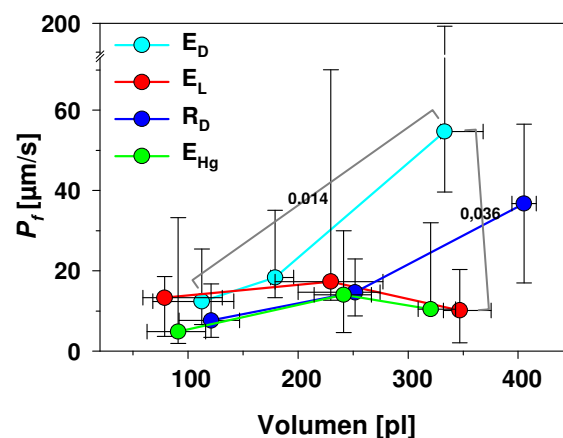


**Abb. 8: Die osmotische Wasserpermeabilität ( $P_f$ ) von Protoplasten und Vakuolen aus den unterschiedlich elongierenden Abschnitten des *Ricinus*-Hypokotyls**

A) Die  $P_f$  von Protoplasten aus elongierendem ( $E_D$ ,  $E_D^*$ ) und ausgewachsenem Hypokotylgewebe ( $R_D$ ,  $R_D^*$ ) dunkel gehaltener Keimlinge; das linke Datenpaar wurde im Rahmen dieser Arbeit, das rechte Datenpaar wurde zur Kontrolle von Alfons Weig nach Ramahaleo et al. (1999) erhoben (unveröffentlicht). B) Die  $P_f$  des Tonoplasten analog zu A ( $E_D$ ,  $R_D$ ), aus der 'Elongationszone' belichteter Keimlinge ( $E_L$ ), sowie aus der Elongationszone dunkel gehaltener Keimlinge nach Inkubation mit Quecksilberionen ( $E_{Hg}$ ). Die Höhe der Balken repräsentiert den Median über  $n$  Einzelwerte (Nummer über den Balken). Die Fehlerbalken markieren den Interquartilbereich. Signifikanzniveaus der Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle ( $E_D$ ) sind über den Fehlerbalken angegeben (U-Test nach Mann & Whitney, zweiseitig).

Cytoplasmaschicht und des Tonoplasts. Dies ist begründet durch das vernachlässigbar kleine Volumen des Cytosols gegenüber dem der Vakuole. Letzteres bedingt nahezu vollständig das Volumen des Protoplasten. Damit strömt Wasser über die genannten drei Barrieren in die Vakuole, wo es die Schwellung des Protoplasten verursacht.

Protoplasten, die der Elongationszone dunkel gehaltener Keimlinge entstammen, zeigen im Median eine  $\sim 3$ -fach höhere  $P_f$  als Protoplasten des ausgereiften Hypokotyls (Abb. 8, A). Dagegen haben die Tonoplasten von Vakuolen, vergleichbare  $P_f$ , unabhängig ob sie aus elongierendem oder nicht elongierendem Gewebe isoliert wurden (Abb. 8, B). Die Sensitivität der vakuolären  $P_f$  elongierender Zellen auf Quecksilberionen ist gering (Faktor 1,8) und nicht signifikant. Die  $P_f$  von Protoplasten und Vakuolen haben in etwa die gleiche Größenordnung ( $5\text{--}35 \mu\text{m/s}$ ). Die  $P_f$  von Vakuolen aus Gewebe dunkel gehaltener Keimlinge scheint direkt proportional zur Zellgröße zu sein (Abb. 9). So sind in der Zone elongierender Zellen die  $P_f$  großer Vakuolen gegenüber denen kleiner Vakuolen signifikant erhöht (Faktor  $\sim 4,4$ ). Dieser Unterschied ist im ausdifferenzierten Hypokotyl weniger ausgeprägt bzw. nicht signifikant. Die vakuolären  $P_f$  großer elongierender Zellen sind durch Quecksilberionen auf das niedrige Niveau von Zellen belichteter Keimlinge reduzierbar (Faktor  $\sim 5,3$ ). Ähnlich der gesamten Vakuolenpopulation (Abb. 8, B) ergeben sich auch für die  $P_f$  kleinerer Vakuolen keine nennenswerten Unterschiede.



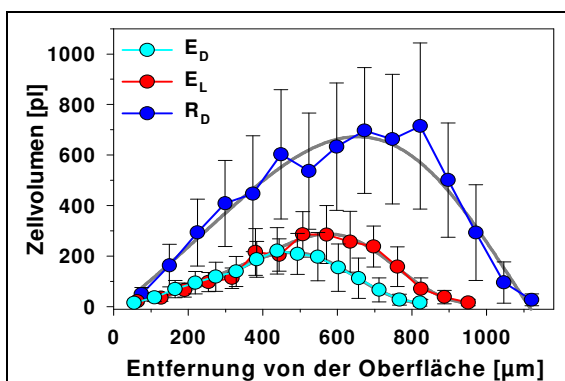
**Abb. 9: Die osmotische Wasserpermeabilität ( $P_f$ ) von Vakuolen aus den unterschiedlich elongierenden Abschnitten des *Ricinus*-Hypokotyls verteilt nach Zellvolumen.**

Gezeigt ist die  $P_f$  der Tonoplasten aus elongierendem ( $E_D$ ) und ausgewachsenem Hypokotylgewebe ( $R_D$ ), aus der 'Elongationszone' belichteter Keimlinge ( $E_L$ ) sowie aus elongierendem Hypokotylgewebe nach Inkubation mit Quecksilberionen ( $E_{Hg}$ ).

Die Datenpunkte repräsentieren den Median für  $P_f$  und Volumen in den Größenklassen 37-164 pl, 164-290 pl und 290-417 pl. Die Fehlerbalken markieren den Interquartilbereich. Signifikante Unterschiede sind an grauen Klammern angegeben ( $P \leq 0,05$ ; U-Test nach Mann & Whitney, zweiseitig).

### 3.3 Stark elongierendes Hypokotyl zeigt eine spezifische radiale Verteilung der zellulären Wasserhaushaltsparameter

Protoplasten bzw. Vakuolen, die aus den unterschiedlichen Hypokotylabschnitten isoliert wurden, bilden relativ heterogene Populationen in Hinblick auf Größe und  $P_i$  sowie wahrscheinlich auch im Hinblick auf Herkunft bezüglich der verschiedenen Gewebearten (Epidermis, Kortex, Leitbündel, Mark usw.). Um Informationen über die räumliche Verteilung wichtiger Parameter des Wasserhaushalts innerhalb eines Hypokotylabschnittes zu erhalten, wurde eine Zelldrucksonde benutzt. Mittels dieser Methode wurde der Turgor ( $P$ ) kortikaler Zellen in der Elongationszone und dem reifen Hypokotyl von dunkel gehaltenen, sowie der 'Elongationszone' belichteter Keimlinge in radialer Richtung verfolgt. Aus Kinetiken der Relaxation von  $P$ , und dessen Abhängigkeit von einer Volumenänderung, wurde die Halbwertszeit ( $T_{1/2}$ ), der elastische Modul ( $\epsilon$ ) und die hydraulische Wasserleitfähigkeit ( $L_p$ ) ermittelt (Kap. 2.4.4). Die so für den zugänglichen Bereich des Kortex erhaltenen Daten wurden in 5 Tiefenintervallen zu je 150  $\mu\text{m}$  zusammengefasst und gegen den Abstand zur Hypokotyl-



**Abb. 10: Zellvolumen in unterschiedlichen Tiefenschichten des Hypokotylkortex.**

Volumina von Kortexzellen aus der Elongationszone ( $E_D$ ) und dem ausdifferenzierten Hypokotyl ( $R_D$ ) dunkel gehaltenen sowie der 'Elongationszone' belichteter Keimlinge ( $E_L$ ) in 15 Tiefenintervallen. Die Datenpunkte repräsentieren das mittlere Volumen von Zellen eines Tiefenintervalls ( $n \sim 10$ ) aus 3-4 Keimlingen. Die indizierten Standardabweichungen des Volumens wurden mittels Fehlerfortpflanzungsgesetz aus den Standardabweichungen der gemessenen, zellulären Längs- und Querschnitte berechnet. Trendlinien der Daten sind grau dargestellt (Weibull, 5 Parameter).

oberfläche aufgetragen (Abb. 10). Weiterhin wurden der resultierende Wasserpotentialgradient über den Kortex ( $\Delta\psi_c$ ), die volumetrische Extensibilität ( $m_c$ ) und der mittlere hydraulische Leitwert ( $L_c$ ) während der Hypokotylelongation berechnet (Kap. 2.4.4). Eine analoge Modellrechnung mit den reduzierten  $L_p$  der nicht-elongierenden Gewebe sollte die physiologische Relevanz hoher  $L_p$  während der Elongation belegen.

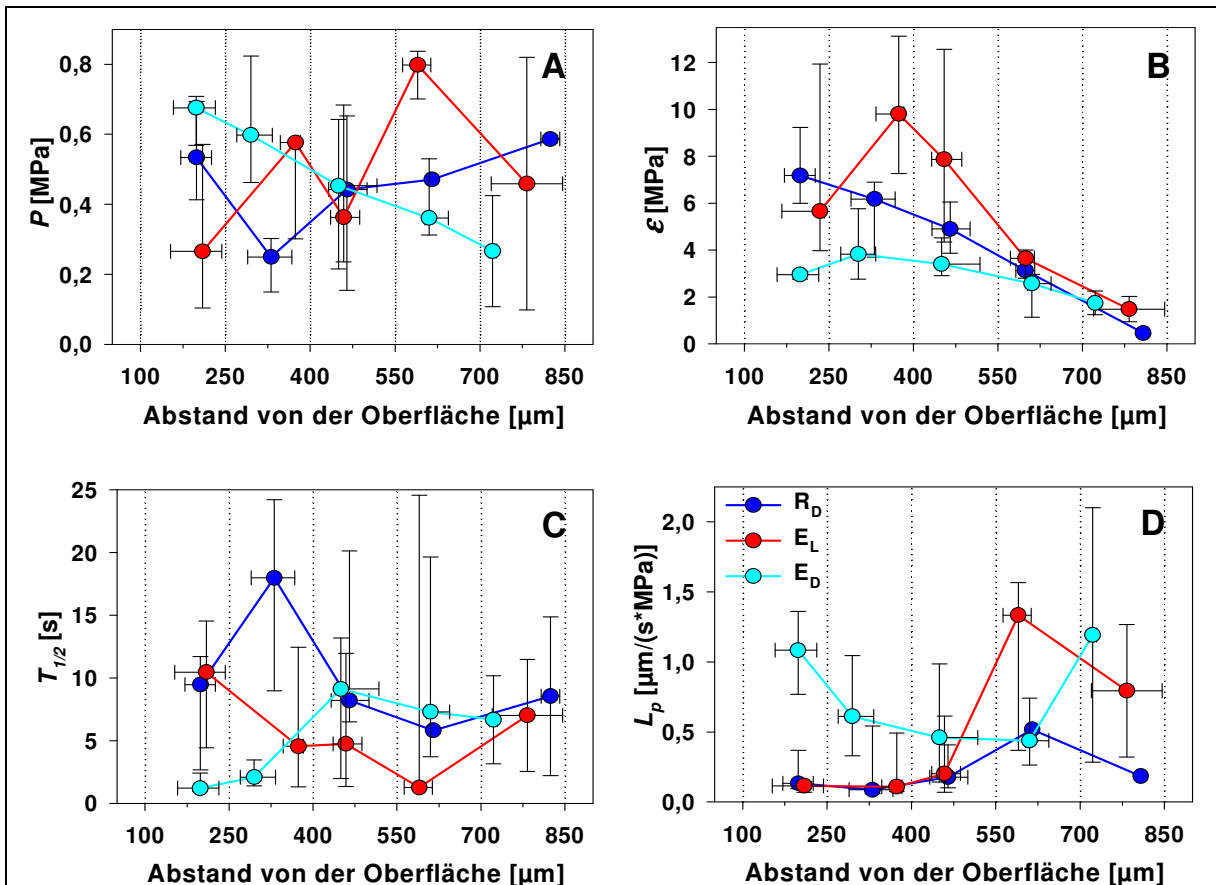
#### 3.3.1 Radiale Verteilung des zellulären Volumens

Zur Berechnung des zellulären  $L_p$  ist die Kenntnis von Zellvolumen und -oberfläche notwendig. Daher wurden diese beiden Parameter für kortikale Zellen der verschiedenen Hypokotylsegmente in Abhängigkeit des Abstands zur Organoberfläche ermittelt. In diesem Fall wurden die erhaltenen Daten in 15 Tiefenintervallen zusammengefasst. Abb. 10 zeigt die charakteristische Verteilung der Zellvolumina im Kortex der Elongationszone und des reifen Hypokotyls dunkel gehaltenen, sowie der 'Elongationszone' belichteter Keimlinge. In allen drei Zonen beschreiben

die zellulären Volumina quer durch den Kortex einen bogenförmigen Verlauf, dessen Maximum im Bereich der Kortexmitte liegt (Tiefenintervall 9).

### 3.3.2 Radiale Verteilung des Turgors ( $P$ )

In Abb. 11, A ist die radiale Verteilung des  $P$  von Kortexzellen der drei unterschiedlich elongierenden Hypokotylzonen dargestellt. In der Zone starker Expansion nimmt  $P$  von der Peripherie in Richtung Kortexinnerem über den ganzen Observationsbereich nahezu linear ab ( $\sim 0,07 \text{ MPa}/_{100 \mu\text{m}}$ ). Diese graduelle Verteilung scheint innerhalb des reifen Hypokotyls nur im



**Abb. 11: Radiäre Verteilung von Parametern des zellulären Wasserhaushalts im Kortex der verschiedenen Hypokotylzonen von belichteten und unbelichteten Keimlingen.**

A) Der Turgor ( $P$ ), B) das elastische Modul ( $\epsilon$ ), C) die Halbwertszeit von Druckrelaxationen ( $T_{1/2}$ ) und D) die hydraulische Wasserleitfähigkeit ( $L_p$ ) von kortikalen Zellen in Abhängigkeit des Abstand von der Hypokotyloberfläche in der elongierenden ( $E_D$ ) und nicht-elongierenden Zone ( $R_D$ ) dunkel gehaltener und der 'Elongationszone' belichteter Keimlinge ( $E_L$ ).

Der untersuchte Bereich des Kortex (100-850  $\mu\text{m}$ ) wurde in 5 Tiefenintervalle zu je 150  $\mu\text{m}$  unterteilt. Die Einzelwerte innerhalb eines Intervalls sind als Median mit Interquartilen für beide Dimensionen zusammengefasst. Die Breite und radiäre Lage der Tiefenintervalle von  $R_D$  sind entsprechend des Hypokotyldurchmessers in dieser Zone um den Faktor  $\sim 1,35$  erhöht. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden sie auf Breite und radiäre Lage der Tiefenintervalle von  $E_D$  bzw.  $E_L$  entsprechend normiert. Die Niveaus signifikanter Unterschiede zwischen zwei Datenpunkten sind im Anhang angegeben (Kap. 7, Tab. XIII).

äußeren Kortex aufzutreten. In weiter innen liegenden Zellschichten scheint der  $P$  mehr oder weniger gleich zu bleiben. In der 'Elongationszone' belichteter Keimlinge zeigt  $P$  innerhalb der äußeren Bereiche keinen nennenswerten Gradienten. Von der Kortexmitte hin zum inneren Kortex steigt er dagegen an und ist dort etwa doppelt so hoch wie in der Elongationszone dunkel gehaltener Keimlinge. Starke Schwankungen der Daten machen eine Aussage über den radialen Verlauf von  $P$  im Kortex und eine Quantifizierung der Unterschiede insbesondere für die nicht-elongierenden Hypokotylzonen schwer.

### 3.3.3 Radiale Verteilung des elastischen Moduls ( $\varepsilon$ )

In Abb. 11, B ist die radiale Verteilung des  $\varepsilon$  von Kortexzellen der drei unterschiedlich elongierenden Hypokotylzonen dargestellt. Innerhalb aller drei Zonen beschreibt  $\varepsilon$  einen nach innen abnehmenden Gradienten. Dieser Gradient ist in der 'Elongationszone' belichteter Keimlinge am stärksten ausgeprägt ( $1,53 \text{ MPa}/_{100 \mu\text{m}}$ ) und  $\sim 2,8$ -fach höher als in elongierendem Gewebe. Im reifen Hypokotyl ist er gegenüber der Elongationszone  $\sim 2,3$ -fach erhöht. Im Tiefenintervall 2 ist der  $\varepsilon$  in den Zellen der Elongationszone 2-3 fach gegenüber den nicht-elongierenden Geweben erniedrigt. Eine qualitative, mikroskopische Analyse zeigte, dass  $\varepsilon$  in den verschiedenen Tiefenintervallen der drei observierten Hypokotylzonen direkt proportional zur Zellwanddicke zu sein scheint. Diese ist ebenso im peripheren Kortex des Hypokotyls von belichteten Keimlingen am größten.

### 3.3.4 Radiale Verteilung der Halbwertszeit zellulärer Druckrelaxationen ( $T_{1/2}$ )

In Abb. 11, C ist die radiale Verteilung von  $T_{1/2}$  im Kortex der drei untersuchten Hypokotylzonen dargestellt. Gegenüber nicht-elongierenden Hypokotylbereichen ist  $T_{1/2}$  im peripheren Kortex der Elongationszone dunkel gehaltener Keimlinge stark erniedrigt und nimmt zur Kortexmitte hin zu. In den nicht elongierenden Geweben des Hypokotyls scheint  $T_{1/2}$  zur Kortexmitte hin abzunehmen und deutet somit auf ihre physikalisch begründete, indirekte Proportionalität mit der Zelloberfläche hin.

### 3.3.5 Radiale Verteilung der zellulären hydraulischen Leitfähigkeit ( $L_p$ )

In Abb. 11, D ist die radiale Verteilung der zellulären  $L_p$  im Kortex der drei unterschiedlich elongierenden Hypokotylzonen dargestellt. Besonders die kortikale Peripherie des elongierenden Hypokotyls zeigt charakteristisch erhöhte Werte der  $L_p$  gegenüber den nicht elongierenden Hypokotylabschnitten (Faktor 5-10). Die zelluläre  $L_p$  belichteter Keimlinge ist im äußeren Kortex gering und scheint zur Mitte hin anzusteigen ( $\sim 0,1 \frac{\mu\text{m}}{\text{s} \cdot \text{MPa}} /_{100 \mu\text{m}}$ ). Die kortikale  $L_p$  des ausdifferenzierten Hypokotyls dunkel gehaltener Keimlinge scheint sich dagegen in radialer Richtung kaum zu verändern ( $< 0,03 \frac{\mu\text{m}}{\text{s} \cdot \text{MPa}} /_{100 \mu\text{m}}$ ). Wieder sind vergleichende Aussagen zu Zellen des inneren Kortex nicht möglich, da für diesen Bereich nur wenige, stark schwankende Daten verfügbar sind.



### 3.3.6 Der Wasserpotentialgradient ( $\Delta\Psi_c$ ) über den Hypokotylkortex

Aus der ermittelten Zuwachsrate während der Elongation des Hypokotyls (15,2 %/h, Abb. 6) und den vorherrschenden  $L_p$  der einzelnen Zellschichten des Kortex (Abb. 11, D), wurde der radial verlaufende  $\Delta\Psi_c$  über den Kortex berechnet (Tab. VI). Darüber hinaus wurden für elongierendes Kortexgewebe  $m_c$  und  $L_c$  ermittelt (Kap. 2.4.4). Zusätzlich wurden diese Berechnungen für ein hypothetisches Modellsystem durchgeführt, in dem das Hypokotyl zwar mit der ermittelten Rate von 15,2 %/h wächst, in dem jedoch die erniedrigten  $L_p$  der nicht-elongierenden Gewebe vorliegen. Für die Berechnungen wurde angenommen, dass die Elongation des Hypokotyls als stationäres Wachstum in allen Zellschichten gleichermaßen erfolgt; außerdem, dass radial fließendes Wasser ausschließlich dem transzellulären Transportweg folgt und daher keine nennenswerten Mengen Wasser entlang des Apoplasts bzw. durch möglicherweise vorhandene Plasmodesmen fließen. Weiterhin wurde für den *yield threshold* ( $Y_c$ ) ein Wert von 0,47 MPa angenommen. Damit ist das Verhältnis von  $P_c$  zu  $Y_c$  gleich wie in stark elongierendem Hypokotyl von *Vigna unguiculata* (Okamoto et al., 1990).

**Tab. VI: Modellberechnung des Wasserpotentials ( $\Delta\Psi_c$ ), der volumetrischen Extensibilität ( $m_c$ ) und des mittleren hydraulischen Leitwerts ( $L_c$ ) im elongierenden Hypokotylkortex**

Gewebe	$P_c$ [MPa]	$Y_c$ [MPa]	$\Delta\Psi_c$ [MPa]	$L_c$ [1/s*MPa]	$m_c$ [1/s*MPa]
$E_D$	0,541	0,466	0,527	8,00 * 10 <sup>-5</sup>	56,6*10 <sup>-5</sup>
$R_D$	0,541	0,466	1,50	2,80 * 10 <sup>-5</sup>	56,6*10 <sup>-5</sup>
$E_L$	0,541	0,466	1,24	3,40 * 10 <sup>-5</sup>	56,6*10 <sup>-5</sup>

Angegeben ist das Hypokotylgewebe, dessen kortikale  $L_p$  zur Berechnung herangezogen wurden ( $E_D$ : Elongationszone dunkel gehaltener Keimlinge,  $R_D$ : reifes Hypokotyl dunkel gehaltener Keimlinge,  $E_L$ : 'Elongationszone' belichteter Keimlinge). Außerdem der Mittelwert von  $P_c$  im elongierenden Hypokotyl. Der Wert für  $Y_c$  wurde in Anlehnung an Okamoto et al. (1990) gewählt; der kortikale  $\Delta\Psi_c$ ,  $L_c$  und  $m_c$  wurden mittels des ermittelten Volumenzuwachses von 15,2 %/h berechnet. Die Daten der hypothetischen Modellsituation sind kursiv gedruckt.

Es zeigt sich, dass während der Elongation unter den angenommenen Bedingungen ein erheblicher  $\Delta\Psi_c$  über den Kortex vorzuherrschen scheint (~0,54 MPa). Der daraus berechnete  $L_c$  ist um den Faktor ~7,1 kleiner als die ermittelte  $m_c$ . Für die angenommene Modellsituation ergibt sich ein hypothetischer  $\Delta\Psi_c$  von bis zu 1,5 MPa.  $L_c$  wäre unter derartigen Bedingungen ~20-fach kleiner als  $m_c$  (Tab. VI).

### 3.4 In Hypokotylgewebe von *Ricinus communis* konnten drei dominierende MIP-Gene identifiziert werden

Der Keimling von *Ricinus communis* und insbesondere dessen Hypokotyl stellt seit langem ein etabliertes Modell zur Erforschung verschiedener Transportvorgänge dar (Kriedemann & Beevers, 1967; Kallarackal et al., 1989; Komor & Thom, 1989; Meshcheryakov et al., 1992; Weig et al. 1994; Köckenberger, 1994). Nachdem gerade in pflanzlichen Systemen die umfangreiche Genfamilie der *Major Intrinsic Proteins* (MIP) als mögliche molekulare Basis des Wassertransports erkannt wurde (Maurel et al., 1993), wurden diese Membranproteine auch in *Ricinus communis* identifiziert.

**Tab. VII: Die zehn bekannten *Ricinus*-MIP und deren ähnlichste *Homologe* aus *Arabidopsis thaliana***

Genname	Plasmid	NCBI-Zugangsnummer	ähnlichstes <i>Arabidopsis thaliana</i> -Homolog
<b><i>RcPIP1-1</i></b>	<i>pR450-16</i> <sup>a</sup>	AJ605566	<i>AtPIP1-4</i>
	<i>pP2L</i> <sup>b</sup>	AJ605574	
<i>RcPIP1-2</i>	<i>pR450-14</i> <sup>a</sup>	AJ605567	<i>AtPIP1-1</i>
<b><i>RcPIP2-1</i></b>	<i>pR450-8</i> <sup>a</sup>	AJ605569	<i>AtPIP2-8</i>
	<i>pP5L</i> <sup>b</sup>	AJ605575	
<i>RcPIP2-2</i>	<i>pR450-3</i> <sup>a</sup>	AJ605565	<i>AtPIP2-4</i>
<i>RcPIP2-3</i>	<i>pR450-4</i> <sup>a</sup>	AJ605568	<i>AtPIP2-2</i>
<b><i>RcTIP1-1</i></b>	<i>pR450-17</i> <sup>a</sup>	AJ605571	<i>AtTIP1-1</i>
	<i>pT4L</i> <sup>b</sup>	AJ605573	
<i>RcTIP1-2</i>	<i>pR450-12</i> <sup>a</sup>	AJ605570	<i>AtTIP1-3</i>
<i>RcTIP3-1</i>	<i>pCRS661</i> <sup>c</sup>	T15177	<i>AtTIP3-2</i>
<i>RcTIP3-2</i>	<i>pCRS831</i> <sup>c</sup>	T15236	<i>AtTIP3-2</i>
<i>RcTIP4-1</i>	<i>pR450-22</i> <sup>a</sup>	AJ605572	<i>AtTIP4-1</i>

Neben den Gennamen sind die Isolationsplasmide gelistet. Diese umfassen die vollständige cDNA (<sup>b</sup>) oder Fragmente der MIP (<sup>a</sup>) bzw. stellen EST-Klone dar (<sup>c</sup>, Van de Loo et al., 1995). Die drei in der vorliegenden Arbeit untersuchten MIP sind fett gedruckt.

#### 3.4.1 Für *Ricinus communis* wurden zehn Vertreter der Familie der MIP identifiziert

Bisher waren für *Ricinus communis* zwei TIP identifiziert (Van de Loo et al., 1995). Im Rahmen von Vorarbeiten konnten mittels RT-PCR und degenerierten Primern Fragmente weitere drei TIP und fünf PIP identifiziert werden (Weig, unveröffentlicht). Die am umfassendsten charakterisierte Gruppe pflanzlicher Aquaporine sind die MIP aus *Arabidopsis thaliana*. Nach der vollständigen Sequenzierung des Genoms dieser Pflanze (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) war es nicht nur möglich alle 35 MIP vollständig zu identifizieren (Johanson et al., 2001; Quigley et al., 2002), für viele dieser Gene liegen eine Vielzahl von Informationen zu

Regulation, Expression und Lokalisation vor. Zur systematischen Einordnung der identifizierten *MIP* aus *Ricinus communis* wurden auf Protein-Basis Sequenzvergleiche mit den 35 *MIP* aus *Arabidopsis thaliana* vorgenommen. Dazu wurde mittels eines Computerprogramms ein *alignment* mit den AS-Sequenzen der 10 bekannten *MIP* aus *Ricinus* und der 35 *MIP* aus *Arabidopsis* generiert (Kap. 2.13), und die jeweils ähnlichsten *MIP*-Paare identifiziert. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Tab. VII dargestellt und zeigt, dass sich auch die Familie der *MIP* aus *Ricinus communis* in verschiedene Unterfamilien aufteilt (*PIP* & *TIP*), welche sich wiederum aus mehreren monophyletischen Gruppen zusammensetzen (*PIP1* & 2; *TIP1*, 2, 3, 4 & 5). Somit sind derzeit in *Ricinus communis* zwei *PIP1*, drei *PIP2*, zwei *TIP1* sowie jeweils ein *TIP3*, *TIP4* und *TIP5* bekannt.

### 3.4.2 Die Volllängenkclone von *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* codieren für potentiell funktionelle *MIP*

Von den *Ricinus*-*MIP* *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* wurde nicht nur eine dominante Expression im Hypokotyl von *Ricinus*-Keimlingen nachgewiesen (Weig unveröffentlicht), es wurde im Rahmen dieser Arbeit auch deren transient erhöhte Expression während der Elongation gezeigt (Kap. 3.6.1.1). Um daher von diesen drei *MIP* Volllängenkclone zu erhalten, wurde ein *screening* einer cDNA-Bank aus *Ricinus*-Hypokotyl durchgeführt (Kap. 2.5.1). Dieses *screening* sollte auch zur Identifizierung weiterer *MIP* führen, welche durch die *RT-PCR* mit degenerierten Primern (Kap. 3.4.1) nicht erfasst worden waren. Für jedes der drei *MIP* wurden spezifische DNA-Sonden hergestellt, mit deren Hilfe das *screening* der cDNA-Bank in zwei Runden durchgeführt wurde. Die zweite Runde lieferte insgesamt ~60 unterschiedlich starke Signale, wonach die zugehörigen Plaques ausgestochen wurden. Mit den Phagenklonen die nur schwache Signale lieferten, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weitergearbeitet. Die Inserts der Phagenklone, die ein besonders starkes Signal lieferten, wurden in den Vektor *pBluescript II KS<sup>+</sup>* umklontiert und zur Identifizierung sequenziert (Kap. 2.5.2). In Tab. VIII sind die so erhaltenen Volllängenkclone von *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* gelistet.

**Tab. VIII: Plasmide aus dem *screening* einer *Ricinus*-Hypokotyl-cDNA-Bank mit spezifischen Sonden für *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1*.**

Plasmid:	Ursprung des Inserts:	Sonde:
pP2L	<i>RcPIP1-1</i> (vollständige codierende Sequenz mit 3'- und 5'-NTR)	<i>RcPIP1-1</i>
pP5L	<i>RcPIP2-1</i> (vollständige codierende Sequenz mit 3'- und 5'-NTR)	<i>RcPIP2-1</i>
pT4L	<i>RcTIP1-1</i> (vollständige codierende Sequenz mit 3'- und 5'-NTR)	<i>RcTIP1-1</i>

Die Namen der Plasmide, die Identität ihrer Inserts und die spezifische Sonde für ihre Isolation sind angegeben. Die Plasmide dienten als Grundlage für alle weiterführenden Arbeiten.

#### 3.4.2.1 Nukleotid- und abgeleitete AS-Sequenz von *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1*

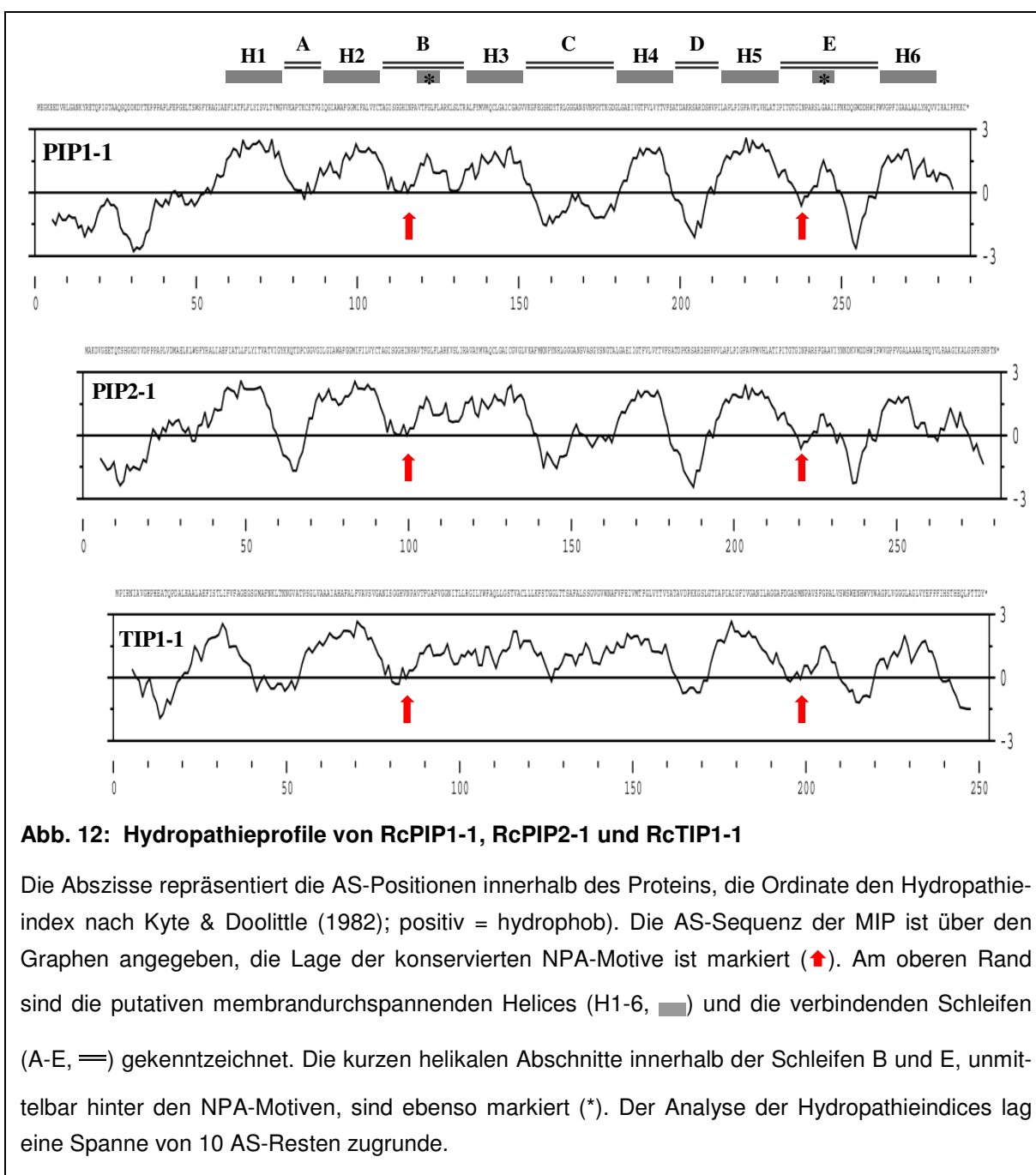
Die Inserts der Klone pP2L, pP5L und pT4L enthielten neben der vollständigen codierenden Sequenz der jeweiligen *MIP* auch Teile der 3'- und 5'-nicht-translatierten Regionen (Kap. 7). Das offene Leseraster aller drei Klone wurde von weiteren möglichen Stopcodons flankiert. Darüber hinaus weisen alle drei Klone im 3'-nicht-translatierten Bereich Adenosin- und Thymin-reiche Domänen auf, welche nach Graber et al. (1999) Signalelemente für die Polyadenylierung darstellen könnten (Abb. 36, Abb. 37, Abb. 38). Für alle drei *MIP* wurde die jeweilige codierende Sequenz in die zugehörige AS-Sequenz übersetzt (Abb. 36, Abb. 37 & Abb. 38).

pP2L enthält ein 1094 Basenpaare (Bp) langes cDNA-Insert des *RcPIP1-1*, dessen längstes offenes Leseraster mit 864 Bp für ein Protein mit 288 Aminosäuren (AS) codiert. Dieses *RcPIP1-1* hat demnach ein vorhergesagtes Gewicht von 30,8 Kilodalton (kD). Das Plasmid pP5L enthält ein 1217 Bp langes cDNA-Insert des *RcPIP2-1*, mit dem längsten offenes Leseraster von 840 Bp, welches für ein Protein mit 280 AS codiert. Dieses *RcPIP2-1* hat ein errechnetes Gewicht von 39,7 kD. Das Insert des Klons pT4L umfasst 1057 Bp und codiert mit 753 Bp für ein Protein mit 251 AS. Dieses mit *RcTIP1-1* benannte Protein hat ein Molekulargewicht von 26,0 kD. Die cDNA aller drei *Ricinus-MIP* schließt außerdem unterschiedlich lange Abschnitte des 3'- und 5'-nicht-translatierten Bereichs mit ein. Alle drei isolierten *MIP* weisen in der abgeleiteten AS-Sequenz die für Aquaporine charakteristischen Asparagin-Prolin-Alanin-Motive auf (NPA-Motive, Abb. 13).

#### 3.4.2.2 Strukturelle Voraussetzungen von *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* für intrinsische Membranproteine

Aus Analysen der dreidimensionalen Struktur gilt für Aquaporine als gesichert, dass sie aus 6 Membran-durchspannenden  $\alpha$ -Helices, 5 interhelikalen Schleifen und den cytosolischen N- und C-Termini aufgebaut sind (Heymann & Engel, 1999; Verkman & Mitra, 2000). Um diese Struktur für die drei untersuchten *MIP* zu bestätigen, wurde eine Hydropathieanalyse nach Kyte & Doolittle (1982) durchgeführt (Abb. 12).

Nach dieser Analyse zeigen alle drei *MIP* stark hydrophobe AS-Reste (Hydropathieindex  $>1,6$ ) besonders in sechs Abschnitten, welche die möglichen transmembranen  $\alpha$ -Helices repräsentieren (Abb. 12, H1-6). Bereiche mit hydrophilen bzw. wenig hydrophoben AS stellen die N- und C-Termini bzw. die putativen interhelikalen Schleifen dar (A-E), die entweder in das Cytosol (B, D) oder das extrazelluläre Kompartiment ragen (A, C, E). Innerhalb der Schleifen B und E befinden sich zwei kleinere Gipfel hydrophober AS-Reste, welche die kurzen, helikalen Abschnitte repräsentieren, die zusammen mit den stark konservierten NPA-Motiven an der Bildung der wasserleitenden Pore beteiligt sind.



### 3.4.2.3 Strukturelle Voraussetzungen von RcPIP1-1, RcPIP2-1 und RcTIP1-1 für deren Substratspezifität

Nach Froger et al. (1998) korreliert die Substratspezifität von MIP mit dem Auftreten von bestimmten AS-Resten an 5 distinkten Positionen (P1-5), die in den interhelikalen Schleifen C (P1) und ε (P2-5) liegen (Abb. 13).

Die 3 untersuchten MIP weisen an den Positionen P2-5 die für orthodoxe Aquaporine typischen AS-Reste Ser, Ala, Phe und Trp/Tyr auf. An Position P1 befindet sich, wie bei den meisten orthodoxen Aquaporinen, ein Phe-Rest als typischer AS-Rest des Glyzeroporin-Konsensus.

### 3.4.2.4 Strukturelle Voraussetzungen von RcPIP1-1, RcPIP2-1 und RcTIP1-1 für eine mögliche Regulation durch Proteinphosphorylierung

Als strukturelle Basis für Phosphorylierungen durch Proteinkinasen weisen die drei untersuchten MIP eine Reihe von Ser-Resten auf. Um als mögliches Phosphorylierungsmotiv in Aquaporinen agieren zu können, sollten die Ser-Reste in cytosolischen Bereichen des Proteins liegen und beiderseits von basischen Aminosäuren in verschiedenen Abständen flankiert werden (Maurel et al., 1997; Johansson et al., 1998; Johansson et al., 2000). RcPIP1-1 weist derartige Ser-Reste an Position 130 und 204, RcPIP2-1 an Position 35, 114, 187 und 273 auf (Abb. 13). Für RcTIP1-1 erfüllt kein Ser-Rest diese Voraussetzungen (Abb. 13). Lediglich das Ser<sup>170</sup> in der kurzen Schleife D könnte als Erkennungsmotiv für Proteinkinasen fungieren (Roberts & Harmon, 1992). Die Ser-Reste 130 (RcPIP1-1) und 114 (RcPIP2-1) liegen in einer für PIP stark konservierten Region innerhalb der interhelikalen Schleife B. Die Ser-Reste 204 und 187 haben RcPIP1-1 und RcPIP2-1 gemeinsam mit AtPIP2-1 (CAB67649) in einem weniger konservierten Bereich der kurzen Schleife D. Darüber hinaus weist RcPIP2-1 zusammen mit AtPIP2-1 und ZmPIP2-5 eine weitere potentielle Phosphorylierungsdomäne an Position 35 der N-terminaren Extension auf. Ein weiteres mögliches Phosphorylierungsmotiv hat es an Position 273 ähnlich wie AtPIP2-1 (Abb. 13) und identisch mit dem PIP2 PM28A aus *Spinacea oleracea* (AAA99274). Für letzteres wurde eine Calcium- und Wasserdefizit-abhängige Phosphorylierung nachgewiesen (Johansson et al., 1996; Johansson et al., 1998). Außerdem wurde das Ser<sub>274</sub> als strukturelle Basis für die hohe Wasserleitfähigkeit von SoPM28A erkannt (Johansson et al., 1998).

**Abb. 13: (gegenüberliegende Seite) Vergleichendes *alignment* der drei *Ricinus*-MIP (unterstrichen) mit Vertretern der wichtigsten pflanzlichen Unterfamilien (PIP, TIP, NIP) und monophyletischen Gruppen (PIP1/2, TIP1/3), sowie der tierischen und prokaryontischen Aqua- und Glyzeropore**

Die zwei NPA-Motive (↓) und weitere vollständig konservierte AS-Reste sind dunkelgrau (\*), stark konservierte AS-Reste (nur in 1 Sequenz anders) sind hellgrau hinterlegt (:). Die für EcGlpF ermittelten 6 putativen membrandurchspannenden Helices (H 1-6, —) mit den 5 interhelikalen Schleifen (A-E, ===) sind gekennzeichnet, ebenso die kurzen helikalen Domänen unmittelbar hinter den NPA-Motiven in den Schleifen B und E (↓ ° ° ° °). Cys-Reste sind türkis hinterlegt. Cys-Reste, die Hg<sup>++</sup>-Sensitivität bei AtTIP1-1 und HsAQP1 bedingen, sind markiert (~). Mögliche Phosphorylierungsmotive sind gelb, entsprechende Ser-Reste rot hinterlegt. *In vitro/vivo* phosphorylierte Domänen von PvTIPα und GmNOD26 sind gekennzeichnet (~). Positionen, die für Wasser- bzw. Glycerinspezifität der MIP diskriminieren, sind angegeben (P 1-5), wobei AS des Glyzeroporein-Consensus braun und AS des Aquaporin-Consensus hellgrün hinterlegt sind. Die Proteinennamen sind am linken, die jeweiligen AS-Positionen am rechten Rand angegeben. Die Zugangsnummern am NCBI sind: CAB71073 (AtPIP1-1), CAA04750 (NtAQP1), CAB67649 (AtPIP2-1), AAD28761 (ZmPIP2-5), AAD31569 (AtTIP1-1), P23958 (PvTIPα), NP000376 (HsAQP1), P08995 (GmNOD26), AAC43518 (EcAqpZ), P11244 (EcGlpF).

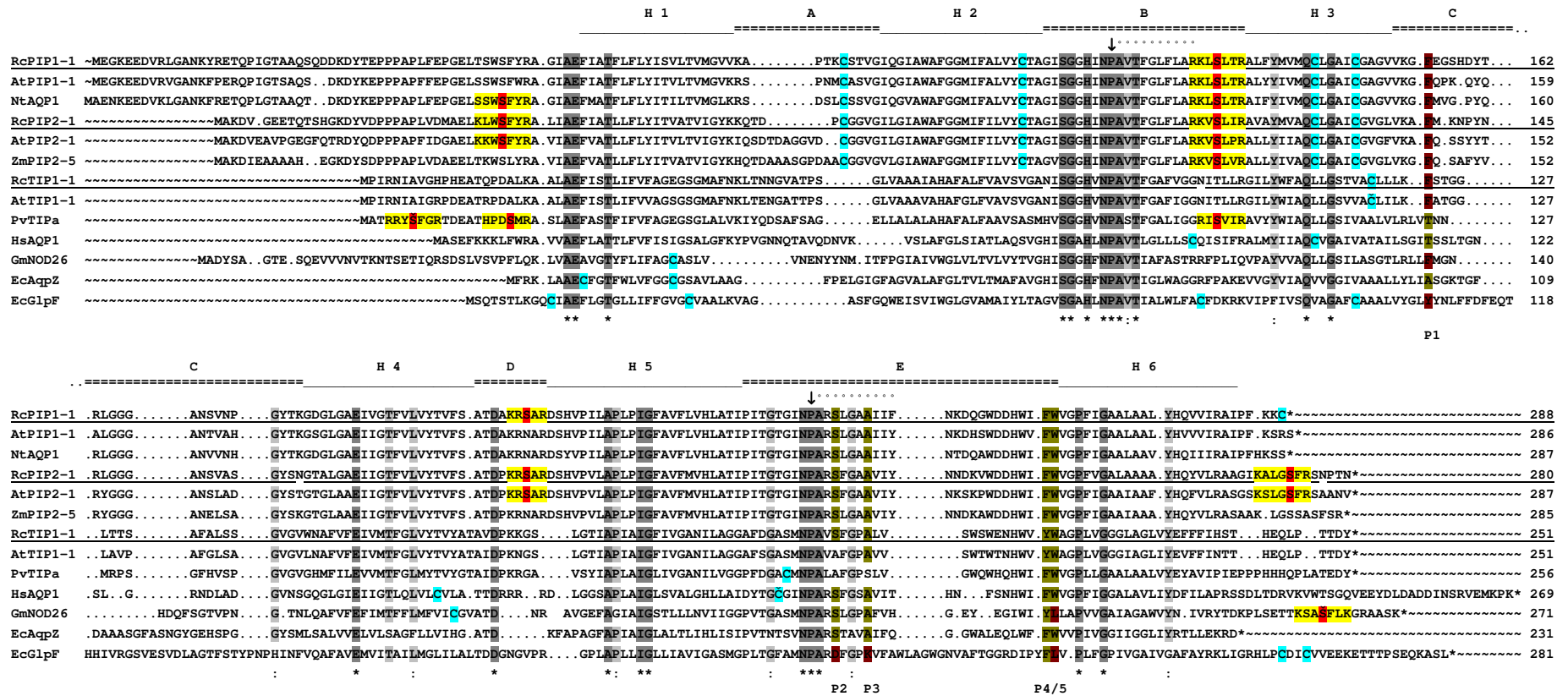


Abb. 13: Vergleichendes alignment der drei *Ricinus*-MIP (untersterne) mit Vertretern der wichtigsten pflanzlichen Unterfamilien (PIP, TIP, NIP) und monophyletischen Gruppen (PIP1 & 2, TIP1 & 3)... (Legende, siehe gegenüberliegende Seite)

### 3.4.2.5 Strukturelle Voraussetzungen von RcPIP1-1, RcPIP2-1 und RcTIP1-1 für Sensitivität für Schwermetalle

Wie aus Abb. 13 zu ersehen ist, weisen RcPIP1-1 und RcPIP2-1 als putative Bindestelle für Quecksilberionen ( $\text{Hg}^{++}$ ) je vier Cys-Reste an den Positionen 84, 106, 142, 147 bzw. 68, 90, 126, 131 auf. Innerhalb der PIP ist das Auftreten dieser Cys-Reste sowie das Fehlen weiterer Sulfhydrylreste sehr stark konserviert und scheint unabhängig von der  $\text{Hg}^{++}$ -Sensitivität zu sein. So sind z. B. AtPIP1-1 und AtPIP2-1  $\text{Hg}^{++}$ -sensitiv (Kammerloher et al., 1994), NtAQP1 und AtPIP2-3 dagegen  $\text{Hg}^{++}$ -insensitiv (Biela et al., 1999; Daniels et al., 1994). Alle vier Homologe haben aber ausschließlich die oben genannten 4 konservierten Cys-Reste. Das Auftreten eines weiteren Cys-Rests wie bei RcPIP1-1 (Position 288) ist nur von sehr wenigen anderen PIP bekannt (z. B.: VhPIP1-1 [AAF71817] und PvPIP1 [AAB72149]). Die Endständigkeit dieses zusätzlichen Sulfhydrylrests scheint innerhalb der PIP ein für RcPIP1-1 einzigartiges Strukturmerkmal zu sein (eigene Analyse). RcTIP1-1 weist als putative  $\text{Hg}^{++}$ -Bindungsdomäne nur einen einzigen Sulfhydrylrest innerhalb der dritten membran-durchspannenden Helix auf (Position 114, Abb. 13). Ähnlich der PIP ist innerhalb der TIP das Auftreten dieses einzelnen Cys-Rests sowie das Fehlen weiterer Sulfhydrylreste stark konserviert, scheint aber immer mit einer  $\text{Hg}^{++}$ -Sensitivität einherzugehen. So weist beispielsweise das dem RcTIP1-1 nahestehendste Homolog aus *Arabidopsis thaliana*, das AtTIP1-1 (86% Identität, Abb. 13),  $\text{Hg}^{++}$ -Sensitivität auf, die ausschließlich auf einen solchen Rest an dieser distinkten Position zurückzuführen ist (Daniels et al., 1996). Keines der untersuchten MIPs weist unmittelbar vor dem zweiten NPA-Motiv einen Cys-Rest auf. An dieser Position tritt beim menschlichen AQP1 ein Sulfhydrylrest auf (Cys<sup>189</sup>), der alleinig die strukturelle Basis für die  $\text{Hg}^{++}$ -Sensitivität dieses MIP zu bilden scheint (Preston et al., 1992).

### 3.4.3 RcPIP1-1, RcPIP2-1 und RcTIP1-1 aus *Ricinus communis* haben nahe verwandte Orthologe

Da Homologien Hinweise auf ähnliche Eigenschaften und Funktionen der analysierten MIP liefern könnten, wurden nahestehende Orthologe identifiziert. Dazu wurde auf der Basis der vollständigen AS-Sequenz für jedes der drei MIP eine Datenbankrecherche durchgeführt (Kap. 2.13). Die jeweils 7 ähnlichsten Orthologe wurden zusammen mit dem entsprechenden *Ricinus*-MIP in einer Tabelle gelistet (Tab. IX, Tab. X & Tab. XI).

Das dem RcPIP1-1 nahestehendste bekannte Homolog ist VhPIP1-1 aus *Vitis hybrida* (*berlandieri*  $\times$  *rupestris*), das die höchste Expression in Seitenwurzeln zeigt und in allen oberirdischen Teilen, so auch in wachsenden Blättern, nur rudimentär ausgeprägt ist (Baiges et al., 2001). Das Homolog CpPIP2 wurde aus der austrocknungstoleranten Auferstehungspflanze *Craterostigma plantagineum* isoliert, in der seine dominante Expression in der Wurzel einer Regulierung durch Trockenstress und Abszissinsäure unterworfen ist (Mariaux et al., 1998). PsTRG-31 aus der Erbse, wird bei niedrigem Turgor induziert (Guerrero & Crossland, 1993) und ist stark in Blüten und den nicht-elongierenden Bereichen der Wurzel exprimiert (Jones & Mullet, 1995). Vergleichbar dazu wird NePIP1-3 aus *Nicotiana excelsior* in Blüte



und Wurzel stark, und in Blättern nur rudimentär exprimiert und unterliegt ebenso einer Induktion durch geringes Wasserpotential (Yamada et al., 1997). Das nahestehendste Homolog aus *Arabidopsis thaliana* ist AtPIP1-4 (Tab. VII). Weitere nahestehende Orthologe sind die funktionalen Aquaporine AtPIP1-1, -2 & -3 aus *Arabidopsis thaliana* (Kammerloher et al., 1994) und NtAQP1 aus *Nicotiana tabacum* (Biela et al., 1999).

**Tab. IX: RcPIP1-1 und die nahestehendsten PIP1 anderer pflanzlicher Spezies**

Name:	Acc. No.:	Organismus:	Ident./Ähnl.:
<b>RcPIP1-1</b>	<b>AJ605574</b>	<b><i>Ricinus communis</i></b>	<b>--/--</b>
VhPIP1-1	AAF71817	<i>Vitis berlandieri/rupestris</i>	90/94
MtPIP1-1	AAK66766	<i>Medicago truncatula</i>	89/93
NePIP1-3	BAA20076	<i>Nicotiana excelsior</i>	89/92
PvPIP1	AAB72149	<i>Phaseolus vulgaris</i>	89/92
PsTRG-31	CAA79159	<i>Pisum sativum</i>	88/92
MspAFI 8-1	AAB86380	<i>Medicago sativa</i>	88/91
CpPIPa2	CAA04652	<i>Craterostigma plantagineum</i>	87/92

Quelle: NCBI, blastp, Blosum80, low complexity filter: off, gap costs 10/1

Ähnlichstes Homolog zu RcPIP2-1 ist VhPIP2-2 ebenfalls aus *Vitis hybrida* (*berlandieri* X *rupestris*), das am stärksten in Stängel und Wurzelspitze, aber auch hoch in expandierenden und sehr gering in ausgewachsenen Blättern exprimiert ist (Baiges et al., 2001). Das Homolog AtPIP2-7, ein funktionelles Aquaporin aus *Arabidopsis thaliana*, ist in der Blüte und Schote dominant exprimiert (Weig et al., 1997). Außerdem wird es durch Kochsalz-Gabe bzw. nach Behandlung mit Abscisinsäure induziert (Pih et al., 1999). ScPIP2a wird u. a. in Griffel und Frucht von *Solanum chacoense* besonders während starker Zellexpansion exprimiert (O' Brien et al., 2002). Weitere nahestehende funktionale Aquaporine sind AtPIP2-1, -2 & -3

**Tab. X: RcPIP2-1 und die nahestehendsten PIP2 anderer pflanzlicher Spezies**

Name:	Acc. No.:	Organismus:	Ident./Ähnl.:
<b>RcAQPP5</b>	<b>AJ605575</b>	<b><i>Ricinus communis</i></b>	<b>--/--</b>
VhPIP2-2	AAF71820	<i>Vitis berlandieri/rupestris</i>	91/97
AtPIP2-8	AAC64216	<i>Arabidopsis thaliana</i>	90/94
PhPIP2-1	AAL49750	<i>Petunia x hybrida</i>	89/93
AtPIP2-7	CAA17774	<i>Arabidopsis thaliana</i>	87/93
BoPIP3	AAG30607	<i>Brassica oleracea</i>	87/93
NtPIP2-1	AAL33586	<i>Nicotiana tabacum</i>	84/90
ScPIP2a	AAG02208	<i>Solanum chacoense</i>	84/89

Quelle: NCBI, blastp, Blosum80, low complexity filter: off, gap costs 10/1

aus *Arabidopsis thaliana* (Kammerloher et al., 1994; Daniels et al., 1994), SoPM28A aus *Spinacia oleracea* (Johansson et al., 1998) und ZmPIP2-5 aus *Zea mays* (Chaumont et al., 2000).

**Tab. XI: RcTIP1-1 und die nahestehendsten TIP1 anderer pflanzlicher Spezies**

<b>Name:</b>	<b>Acc. No.:</b>	<b>Organismus:</b>	<b>Ident./Ähnl.:</b>
<b>RcTIP1-1</b>	<b>AJ605573</b>	<b><i>Ricinus communis</i></b>	<b>--/--</b>
BoTIP26-1	AAB51393	<i>Brassica oleracea</i>	87/92
BoTIP26-2	AAN05780	<i>Brassica oleracea</i>	87/92
AtTIP1-1	AAD31569	<i>Arabidopsis thaliana</i>	86/92
AtTIP1-2	BAB01832	<i>Arabidopsis thaliana</i>	86/92
PyγTIP	BAB12722	<i>Pyrus communis</i>	84/91
RsTIP1-1	BAA12711	<i>Raphanus sativus</i>	83/88
BnγTIP2	AAD39372	<i>Brassica napus</i>	82/88

Quelle: NCBI, blastp, Blosum80, low complexity filter: off, gap costs 10/1

Innerhalb der relativ heterogenen monophyletischen Gruppe der TIP1 sind die dem RcTIP1-1 nahestehendsten Orthologe BoTIP26-1 und BoTIP26-2. Das Ortholog BnγTIP2 scheint am Initialwachstum der Primärwurzel von Rapssamen beteiligt zu sein (Gao et al., 1999). Die Expression des orthologen Wasserkanals RsTIP1-1 korreliert mit der Elongationsaktivität des Hypokotyls und scheint durch Licht reguliert zu werden (Higuchi et al., 1998). Das funktionelle Aquaporin BoTIP26-1 und dessen Homolog BoTIP26-2 sind stark in meristematischen Zellen und lebenden Xylemkompartimenten von *Brassica oleracea* exprimiert. Diese Expression korreliert außerdem direkt proportional mit dem vorherrschenden Wasserdefizit (Barrieu et al., 1998; Barrieu et al., 1999). Für BoTIP26-1 wurde eine spezifische Expression im Tonoplasten nachgewiesen, wo es zu einer Vergrößerung der Vakuolen zu führen scheint (Reisen et al., 2003). Salzstress und Behandlung mit Abscisinsäure induzieren die Expression von AtTIP1-2, einem nahestehenden *TIP1* aus *Arabidopsis thaliana* (Pih et al., 1999). Das funktionelle, Quecksilber-sensitive Aquaporin AtTIP1-1 aus der gleichen Spezies wird in Stängeln der Infloreszenz nur während der Elongation exprimiert (Maurel et al., 1993; Phillips & Huttly, 1994; Hanzawa et al., 1997) und scheint rudimentär auch Harnstoff zu transportieren (Klebl et al., 2003).

### 3.5 RcPIP2-1 und RcTIP1-1 aus Hypokotylgewebe sind funktionelle Wasserkanäle

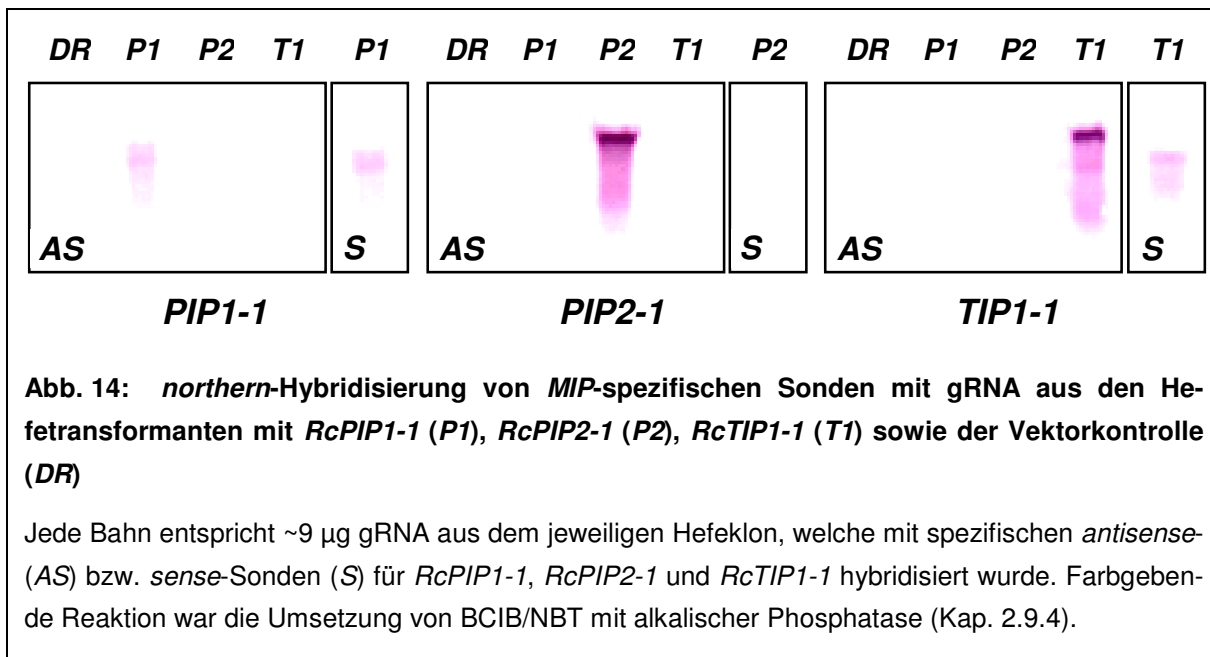
*RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* zeigen nahe Verwandtschaft sowie gemeinsame Struktur- und Sequenzeigenschaften mit *MIP* anderer pflanzlicher Spezies (Kap. 3.4.1), die für funktionelle Wasserkanäle codieren. Um auch auch für *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* Aquaporin-Aktivität nachzuweisen, wurden die drei *MIP* heterolog in der Mutante *NY17* von *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Diese Hefemutante ist in einem essentiellen Gen des sekretorischen Apparats defizient (*sec6-4*) und akkumuliert unter nicht-permissiver Temperatur *post-Golgi* Vesikel, die in Ihrer Proteinausstattung zelluläre Membranen repräsentieren sollten (Walworth & Novick, 1987). Nach der Isolation dieser Vesikel wurde mittels spezifischer Antikörper das erfolgreiche *targeting* der jeweiligen *MIP* in die Vesikelmembranen nachgewiesen. Mittels der *stopped-flow* Spektroskopie sollte die Aquaporin-Aktivität in den Vesikelmembranen nachgewiesen und die untersuchten *MIP* funktionell charakterisiert werden.

#### 3.5.1 Heterologe Expression von *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur heterologen Expression wurden die spezifischen cDNA der *Ricinus-MIP* in den Hefeexpressionsvektor pDR195 umklontiert und in kompetente *NY17*-Zellen transformiert (Kap. 2.6). Der Erfolg der Transformation wurde durch Nachweis der *MIP*-spezifischen mRNA im *northernblot* überprüft. Die erfolgreich verlaufene Translation und Insertion der *Ricinus-MIP* in die Vesikelmembran der Hefen wurde mittels spezifischer Antikörper im *westernblot* nachgewiesen.

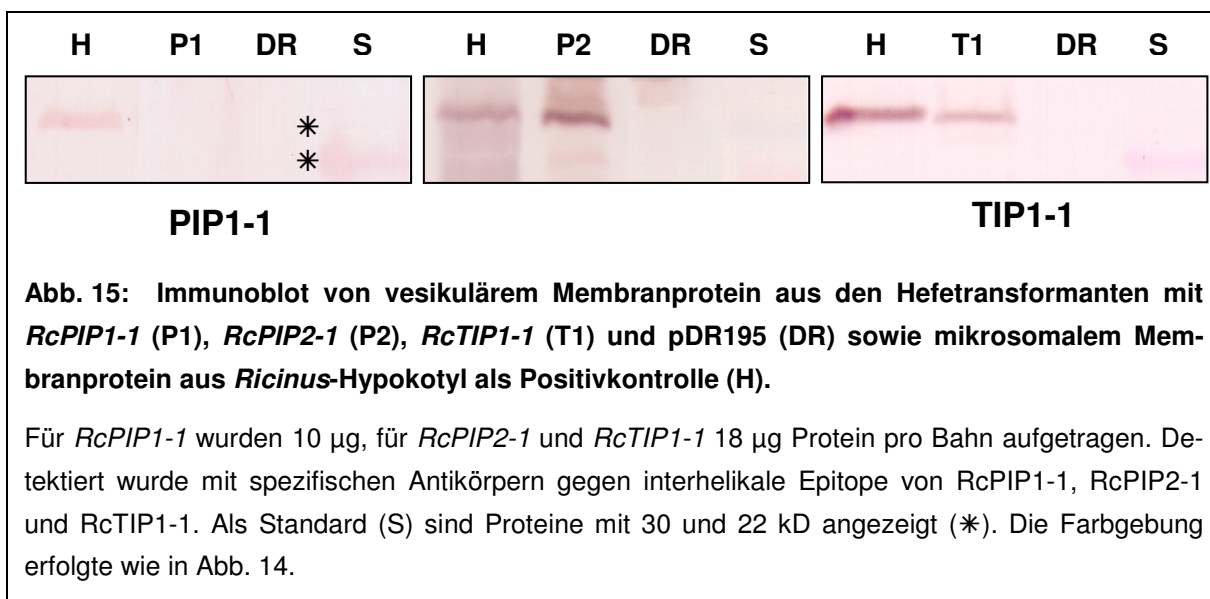
##### 3.5.1.1 *RcPIP2-1*- und *RcTIP1-1*-transformierte Hefen exprimieren die spezifischen *MIP*-Transskripte

*Northern*-Hybridisierungen mit spezifischen *antisense*-Sonden lieferten für die *RcPIP2-1*- und *RcTIP1-1*-Transformanten starke Signale, die weder für die Vektorkontrollen noch für die anderen Transformanten auftraten. (Abb. 14) Die Negativkontrolle mit der jeweils spezifischen *sense*-Sonde lieferte hier allenfalls ein sehr schwaches Signal, das außerdem mit einer Bande geringfügig höherer Laufgeschwindigkeit korrelierte. In gRNA aus Hefen die mit *RcPIP1-1*-Expressionsplasmiden transformiert wurden, trat im *northernblot* sowohl mit einer spezifischen *antisense*- als auch mit der *sense*-Sonde nur diese schwache Markierung auf. Die Funktionalität der Sonden wurde durch einen *northernblot* mit gRNA aus *Ricinus*-Gewebe verifiziert (Kap. 3.6.1.1).



### 3.5.1.2 Die transformierten *MIP RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* werden erfolgreich translatiert und in die Vesikelmembran inseriert

*Immunoblots* mit Membranprotein aus isolierten Vesikeln und spezifischen Antikörpern gegen Epitope der verschiedenen MIP lieferten für *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* ein Signal, das ein ~28 kD großes Protein repräsentiert (Abb. 15). Für Mikrosomen aus dem Ricinus-Hypokotyl wurde ein Protein der gleichen Molekülmasse detektiert. In Vesikelprotein aus *RcPIP1-1*-Hefetransformanten scheint der spezifische Antikörper kein entsprechendes Antigen zu erkennen. In Vesikelextrakten aus Vektor-transformierten Hefeklonen trat keinerlei Färbesignal auf.



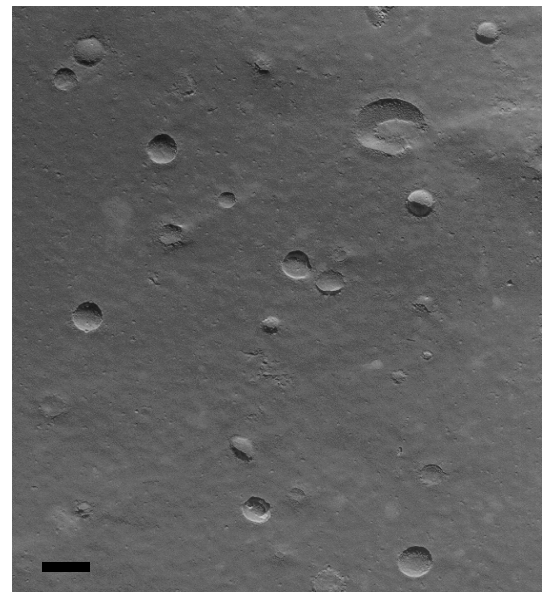
### 3.5.2 *Post-Golgi Vesikelsuspensionen sind heterodispers*

Aus NY17-Hefetransformanten, die *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* heterolog exprimieren, wurden nach Wärmebehandlung *post-Golgi* Vesikel isoliert (Kap. 2.7). Um das Volumen der isolierten Vesikel bestimmen zu können, wurden elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen der erhaltenen Vesikelsuspensionen gemacht (Abb. 16) und der Durchmesser der abgebildeten Vesikel gemessen (Kap. 2.7). Aus den erhaltenen Daten wurde der mittlere Vesikeldurchmesser in den verschiedenen Suspensionen berechnet (Abb. 17, B). Die Daten sollten weiterhin Aufschluss darüber geben, ob möglicherweise Populationen von unterschiedlich großen Vesikeln auftraten (Abb. 17, A).

Die Verteilung des Durchmessers von Vesikeln der Vektortransformante zeigt einen deutlichen Gipfel zwischen 100 und 110 nm. Dieses Maximum ist bei Vesikeln der *RcPIP2-1*-exprimierenden Hefezellen um ~10 nm hin zu größeren Vesikeldurchmessern verschoben. Die Vesikelsuspensionen beider Hefeklonen scheinen neben der dominierenden Population von Vesikeln mit Durchmessern von 100-120 nm noch eine weitere Population größerer Vesikel aufzuweisen (Durchmesser >300 nm).

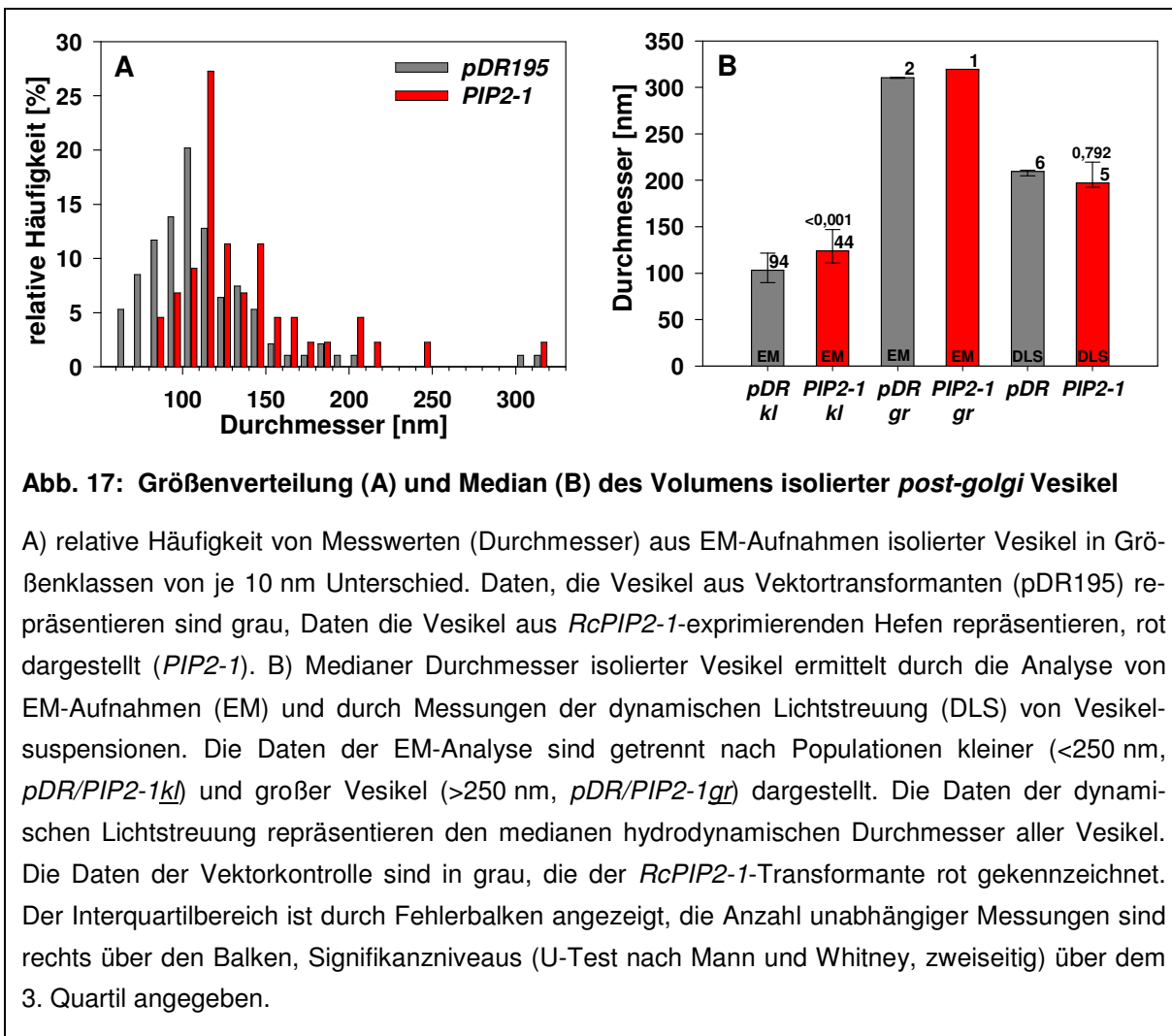
Im Median haben die kleineren Vesikel der *RcPIP2-1*-Klone einen um ~20% signifikant größeren Durchmesser als die entsprechenden Vesikel der pDR195-Klone. Die wenigen Vertreter der Population größerer Vesikel haben Durchmesser zwischen 310-320 nm. Da eine EM-Aufnahme immer nur einen kleinen Ausschnitt der gesamten Vesikelpopulation einer Suspension repräsentiert, wurde das so ermittelte Vesikelvolumen durch Messungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS) überprüft (Kap. 2.7). Bei dieser Methode zur Größenmessung von Partikeln in Suspensionen impliziert die mittlere Partikelgröße alle auftretenden Größenpopulationen von Vesikeln. Eine Identifizierung dieser Populationen ist mit der Methode der DLS grundsätzlich möglich, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen.

Aus den Daten der DLS wurden für beide Hefetransformanten die mittleren hydrodynamischen Durchmesser der isolierten Vesikel berechnet (Kap. 2.7). Diese liegen dem Werte nach zwischen den Durchmessern für kleinere und größere Vesikeln die aus der EM-Analyse ermittelt wurden (Abb. 17, B). Ein signifikanter Unterschied in der Vesikelgröße zwischen der *RcPIP2-1*-Hefe und der Vektorkontrolle wurde hierbei nicht evident. Um die Daten der DLS mit denen der EM-Aufnahmen vergleichen zu können, wurden aus letzteren ebenso die mittleren Durchmesser der isolierten Vesikel berechnet (Kap. 2.7). Diese liegen mit 142 nm



**Abb. 16: Isolierte Trans-Golgi-Vesikel in einer EM-Aufnahme**

Die Aufnahme entstand durch Gefrierbruch von Vesikelsuspension (Kap. 2.7). Der Maßstab am unteren Rand repräsentiert 200 nm.



(Vektorkontrolle) und 172 nm (*RcPIP2-1*-Transformante) etwas unter den hydrodynamischen Durchmessern, welche mittels DLS ermittelt wurden.

### 3.5.3 *Post-Golgi* Vesikel aus *RcPIP2-1*- und *RcTIP1-1*-transgenen Hefen bilden eine erhöhte osmotische Wasserpermeabilität aus

In einer *stopped-flow* Apparatur wurden Suspensionen isolierter *post-golgi* Vesikel aus den *PIP2-1*-, *TIP1-1*- und pDR195-Hefemutanten mit hypertonischem Medium gemischt und die so ausgelöste Schrumpfung der Vesikel über eine Messung des Streulichts detektiert. Über die derart generierten Schrumpfungskinetiken wurden Regressionen montiert, mit Hilfe derer die  $P_i$  der jeweiligen Vesikelmembranen berechnet wurde (Kap. 2.7).

Abb. 18 zeigt beispielhaft zwei repräsentative Schrumpfungskinetiken für Vesikel, die aus *RcPIP2-1*- bzw. pDR195-transgenen Hefeklonen isoliert wurden. Beide Kinetiken beschreiben deutlich eine doppelt exponentielle Funktion, die aus einer schnellen und einer parallel ablaufenden, langsamen Reaktion zusammengesetzt ist. In den durchgeführten Messungen folgten die Schrumpfungskinetiken der Vesikel dieser Funktion, unabhängig von der Mess-temperatur und unabhängig vom Hefeklon, aus dem sie isoliert wurden. Darüber hinaus lässt sich demonstrieren, dass für Vesikel aus Hefen, die *RcPIP2-1* exprimieren, beide Reaktionen

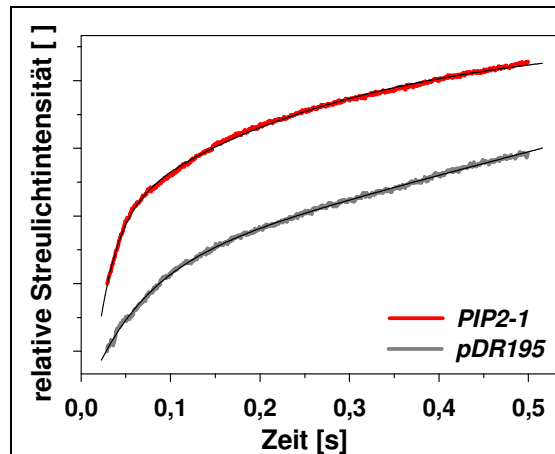
vergleichsweise schneller ablaufen als für Vesikel, die aus der Vektorkontrolle isoliert wurden (Abb. 18). Bei gleichem osmotischem Gradienten ist die Geschwindigkeitskonstante der Schrumpfungskinetiken indirekt proportional zum Vesikelvolumen. Zur Berechnung der vesikulären  $P_f$  wurde daher postuliert, dass die schnelle Teilfunktion die Population der kleinen, die langsame Reaktion die der großen Vesikel repräsentiert (Kap. 3.5.2). Zur Berechnung des  $P_f$  wurden die korrespondierenden Vesikelvolumen aus der Auswertung der elektronenmikroskopischen Abbildungen herangezogen (Abb. 17, B).

Der osmotisch getriebene Wasserfluss durch Protein-Poren ist gegenüber einem Wasserfluss über die doppelte Lipidschicht durch eine erhöhte  $P_f$ , sowie durch eine geringere  $E_a$  charakterisiert (Wayne & Tazawa, 1990). Daher werden ein hoher  $P_f$  sowie eine geringe  $E_a$  von osmotisch getriebenem Wasserfluss als Indizien für eine Beteiligung aktiver Aquaporine gewertet (Überblick in Tyerman et al., 1999). Um Aufschluss über beide Parameter zu erhalten, wurden Schrumpfungskinetiken mit Vesikeln der *RcPIP2-1*-, *RcTIP1-1*- und pDR195-Hefetransformanten bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen und die jeweiligen  $P_f$  ermittelt. In Abb. 19 sind diese  $P_f$  für die Populationen kleiner und großer Vesikel in Abhängigkeit der Temperatur im Arrhenius-Blot dargestellt.

Die Ergebnisse der *stopped-flow* Messungen zeigen deutlich, dass Membranen großer und kleiner Vesikel aus *RcPIP2-1*-transgenen Hefen gegenüber den entsprechenden Vesikeln der Kontrollhefen insgesamt eine signifikant erhöhte  $P_f$  haben. Dies trifft bei *RcTIP1-1*-transgenen Hefen nur für Membranen großer Vesikel zu. Eine deutlich reduzierte Temperaturabhängigkeit der  $P_f$  zeigen die großen und kleinen Vesikel der *RcPIP2-1* transgenen Hefe, sowie die kleinen Vesikel des *RcTIP1-1*-Hefeklons (Abb. 19). Über die Temperaturabhängigkeit der  $P_f$  großer Vesikel des *RcTIP1-1*-Hefeklons lässt sich aufgrund der geringen Datenmenge keine gesicherte Aussage machen (Abb. 19, B).

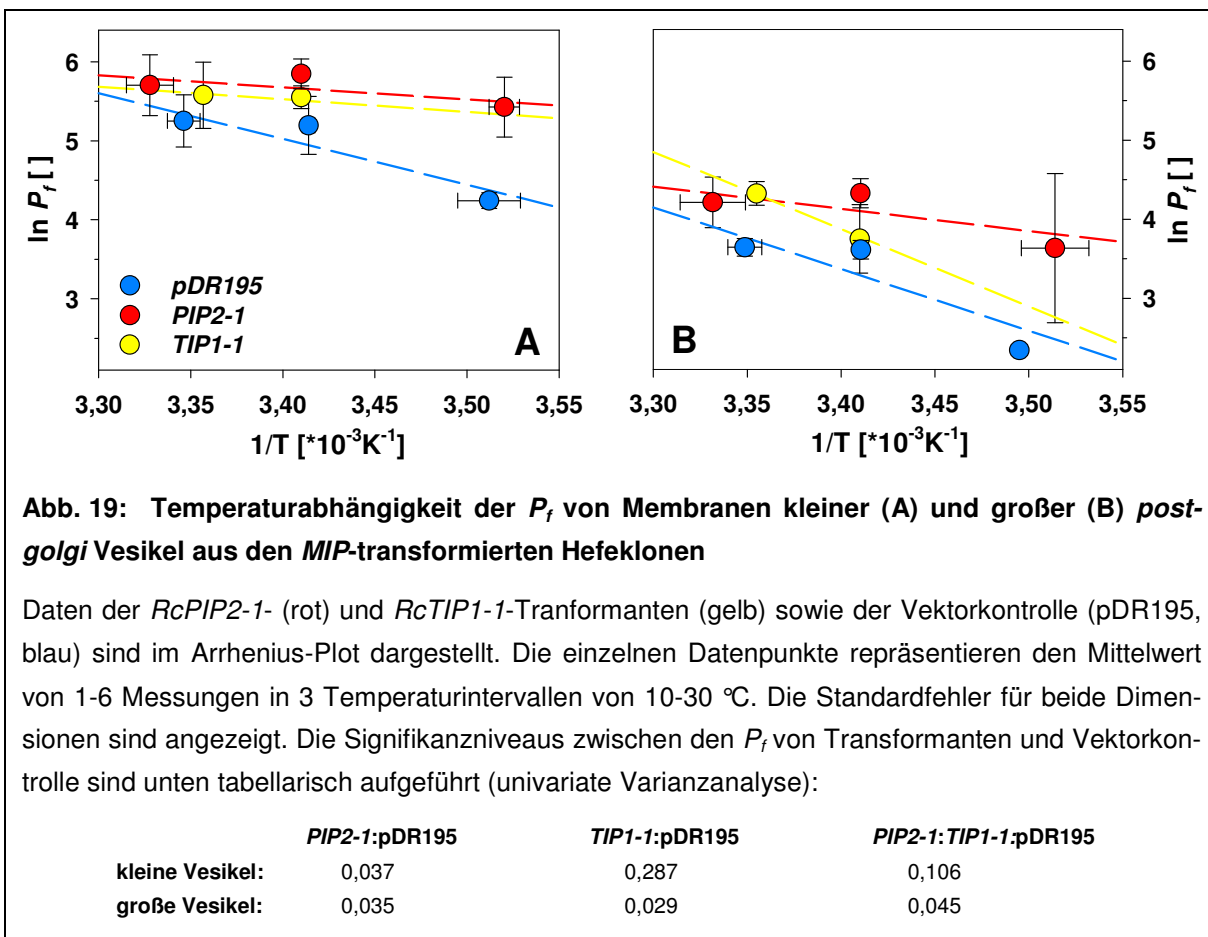
Die Ergebnisse der *stopped-flow* Messungen zeigen deutlich, dass Membranen großer und kleiner Vesikel aus *RcPIP2-1*-transgenen Hefen gegenüber den entsprechenden Vesikeln der Kontrollhefen insgesamt eine signifikant erhöhte  $P_f$  haben. Dies trifft bei *RcTIP1-1*-transgenen Hefen nur für Membranen großer Vesikel zu. Eine deutlich reduzierte Temperaturabhängigkeit der  $P_f$  zeigen die großen und kleinen Vesikel der *RcPIP2-1* transgenen Hefe, sowie die kleinen Vesikel des *RcTIP1-1*-Hefeklons (Abb. 19). Über die Temperaturabhängigkeit der  $P_f$  großer Vesikel des *RcTIP1-1*-Hefeklons lässt sich aufgrund der geringen Datenmenge keine gesicherte Aussage machen (Abb. 19, B).

Aus den linearen Regressionen durch die vesikulären  $P_f$  bei unterschiedlichen Temperaturen wurde für die analysierten Hefeklonen die mittlere  $P_f$  bei 20 °C ermittelt und die Aktivierungsenergie ( $E_a$ ) für den osmotisch getriebenen Wasserfluss berechnet (Tab. XII). Kleine Vesikel aus *RcPIP2-1*-exprimierenden Hefen zeigen demnach eine ca. doppelt erhöhte  $P_f$  gegenüber denen der Vektorkontrolle. Die großen Vesikel dieses Hefeklons haben gegenüber der Kontrolle eine ~2,2-fach erhöhte  $P_f$ .



**Abb. 18:** Charakteristische Schrumpfungskinetiken isolierter *post*-Golgi Vesikel in hypertonischem Medium

Detektiert wurde die Intensität von 90 ° gestreutem Licht in einer *stopped-flow* Apparatur. Die Kinetik von Vesikeln aus der *RcPIP2-1*-Transformante ist rot (*PIP2-1*), die der Vektorkontrolle grau dargestellt (*pDR195*). Die Regressionsfunktionen (schwarz) sind doppelt-exponentiell.



Kleine Vesikel der *RcTIP1-1*-exprimierenden Hefen zeigen nur eine ~1,7-fach erhöhte  $P_f$  gegenüber denen des Kontrollklons. Die  $P_f$  der großen Vesikel dieser Transformante ist ~1,6-fach gegenüber der Kontrolle erhöht. Insgesamt scheint die  $P_f$  kleiner Vesikel um den Faktor von ~5 höher als die der großen Vesikel zu sein (Abb. 19, Tab. XII). Die niedrige  $E_a$  ist für kleine und große Vesikel aus der *RcPIP2-1*- und für kleine Vesikel aus der *RcTIP1-1*-Transformante charakteristisch für transmembranen Wasserfluss unter Beteiligung von aktiven Aquaporinen. Für Vesikel beider Größenpopulationen aus Kontrollhefe und für große Vesikel der *RcTIP1-1*-Transformante wurden für den osmotisch getriebenen Wasserfluss  $E_a$  berechnet, die biologische Membranen ohne aktive Aquaporine repräsentieren (Tyerman et al., 1999).

**Tab. XII: Osmotische Wasserpermeabilität ( $P_f$ ) und Aktivierungsenergie ( $E_a$ ) von Vesikelmembranen der MIP-transgenen Hefeklone**

Hefeklon	kleine Vesikel		große Vesikel	
	$P_f$ [ $\mu\text{m}/\text{s}$ ]	$E_a$ [ $\text{kJ}/\text{mol}$ ]	$P_f$ [ $\mu\text{m}/\text{s}$ ]	$E_a$ [ $\text{kJ}/\text{mol}$ ]
<i>RcPIP2-1</i>	286	12,4	60,2	22,8
<i>RcTIP1-1</i>	247	13,0	43,6	80,0
pDR195	143	47,0	27,0	63,4

Die  $P_f$  wurde bei 20 °C, die  $E_a$  aus der Steigung der Regressionen ermittelt (Abb. 19, Kap. 2.7).

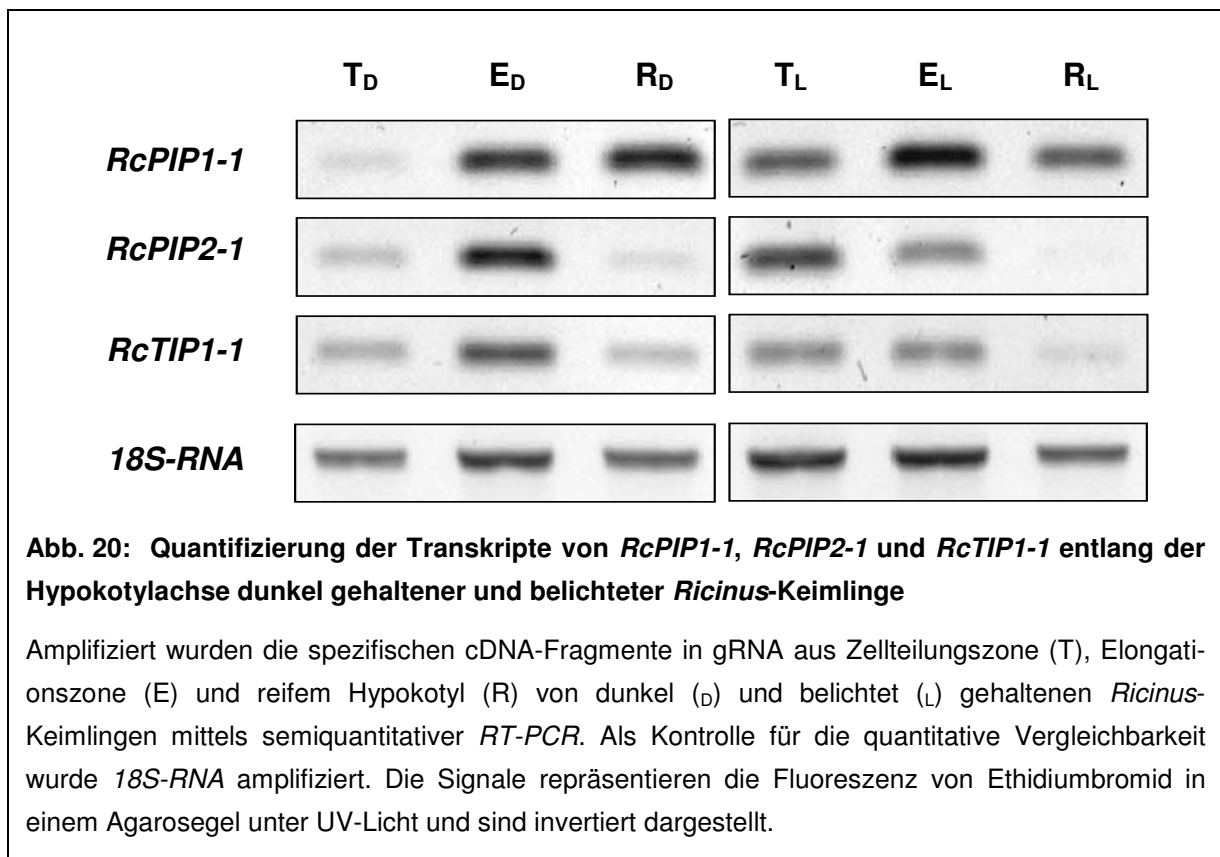


### 3.6 *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* sind im Hypokotyl dominant exprimiert, jedoch unterschiedlich lokalisiert

Die räumliche und zeitliche Ausprägung der *MIP*-Gene lässt u. U. Rückschlüsse über deren physiologische Funktion zu. Um eine mögliche Rolle während des Vorgangs der Zellstreckung aufzuzeigen, wurde die Expression von *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* im *Ricinus*-Hypokotyl analysiert. Dabei lag der Fokus auf jenen Abschnitten, welche in den zeitlichen und räumlichen Ablauf bzw. in die Regulation des Streckungswachstums involviert sind und dabei einen charakteristischen Wasserhaushalt aufweisen (Kap. 3.3). Neben einer gewebespezifischen Quantifizierung der *MIP*-Genprodukte (Kap. 3.6.1) sollte deren Lokalisierung auf zellulärer Ebene detailliertere Einblicke in mögliche zellspezifische Funktionen der *MIP* liefern (Kap. 3.6.2).

#### 3.6.1 Die Expression von *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* korreliert entlang der Hypokotylachse unterschiedlich stark mit der Elongation

Die Ausprägung eines Gens kann (post-)transkriptionell und (post-)translational unterschiedlich reguliert werden. Um daher eine physiologische Funktion von *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* ableiten zu können, wurde deren Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene quantifiziert.

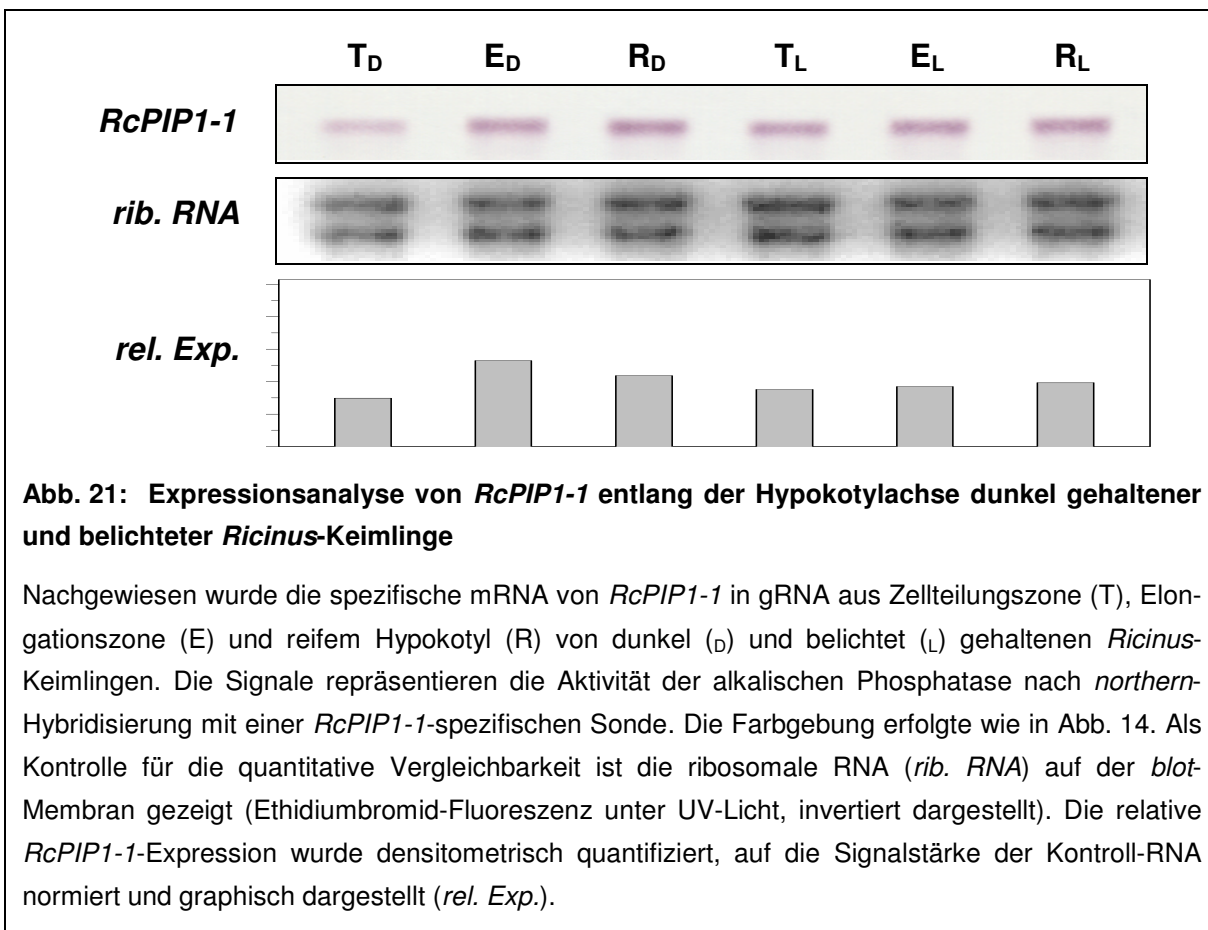


### 3.6.1.1 Auf Transkriptionsebene sind *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* verstärkt in elongierendem Hypokotyl exprimiert

Um herauszufinden, inwieweit die Expression von *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* zusammen mit der Elongationsaktivität variiert, wurde entlang der Hypokotylachse die spezifische mRNA dieser *MIP*-Gene mittels semiquantitativer *RT-PCR* quantifiziert.

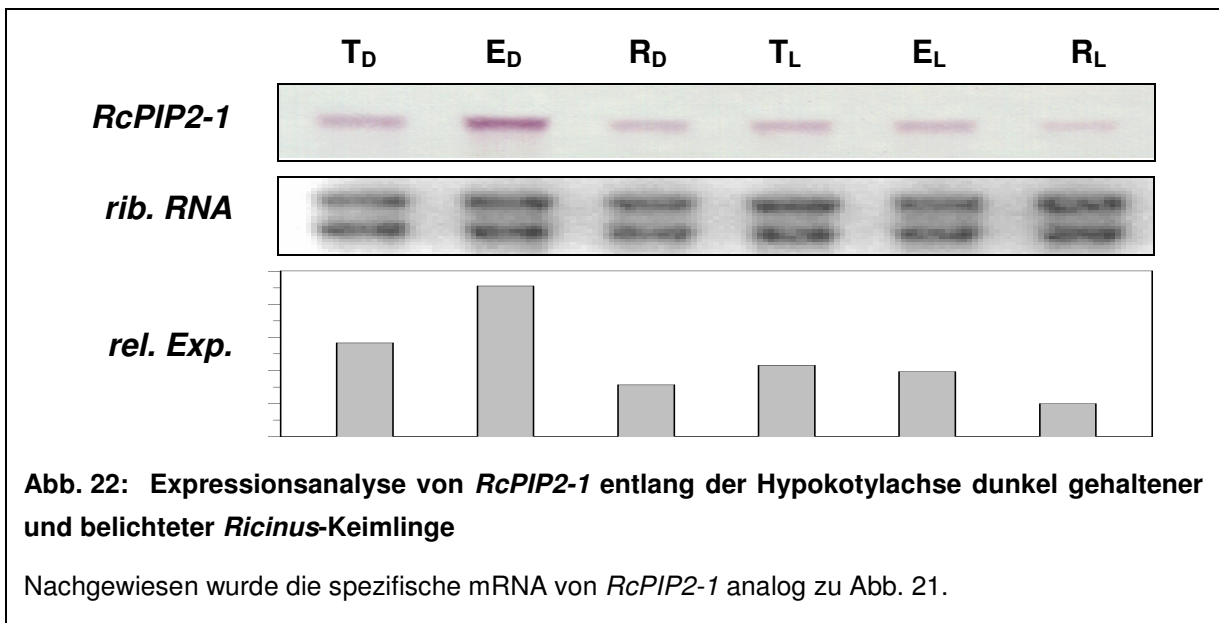
In Abb. 20 sind die Signale der Amplifikationsprodukte für die verschiedenen Gene und Hypokotylzonen dargestellt. In dunkel gehaltenen Keimlingen zeigen alle drei *MIP* eine deutlich gesteigerte Expression in der Zone starken Streckungswachstums verglichen mit der Zellteilungszone (Abb. 20, E<sub>D</sub>). Dieses hohe Expressionslevel wird im Falle von *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* wieder stark reduziert, wenn die Zellstreckung entwicklungsabhängig bzw. nach Belichtung zum Erliegen kommt (Abb. 20, R<sub>D</sub>/E<sub>L</sub>). In der Zellteilungszone ist für *RcPIP2-1* ein leichter Anstieg der Transkriptmenge nach Belichtung zu erkennen, der für *RcTIP1-1* innerhalb des Schwankungsbereichs der Kontrolle liegt (Abb. 20, T<sub>L</sub>). *RcPIP1-1* bleibt im Dunkeln auch nach Vollendung der Zellexpansion induziert (Abb. 20, R<sub>D</sub>/E<sub>L</sub>).

Eine semiquantitative *RT-PCR* ist durch die Verfügbarkeit von Primern und freien Nukleotiden limitiert. Um dadurch verursachte Quantifizierungsfehler ausschließen zu können bzw. um die Ergebnisse der *RT-PCR* zu bestätigen, wurde die Expression von *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1*, und *RcTIP1* in den unterschiedlichen Hypokotylabschnitten darüber hinaus mittels *northern*-Hybridisierungen quantifiziert. Die Signalstärken der spezifischen *MIP*-Transkripte wurden densitometrisch quantifiziert und auf das Level der jeweiligen gRNA normiert.

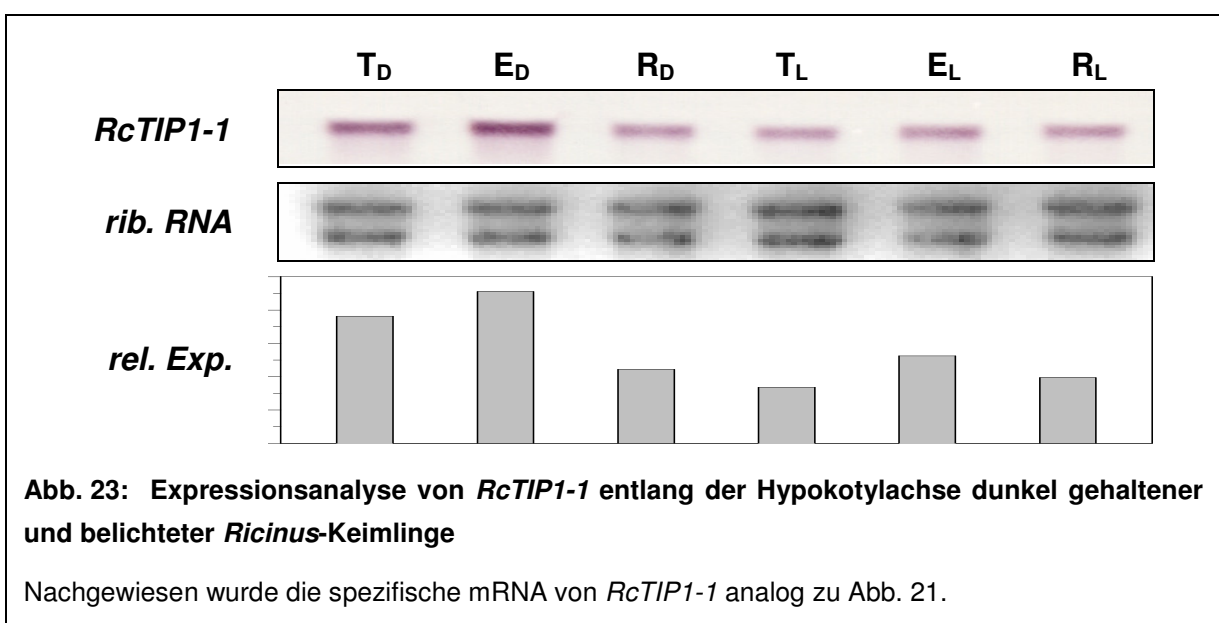


In den unterschiedlichen Hypokotylzonen konnten für alle drei *MIP*-Gene die Ergebnisse der semiquantitativen *RT-PCR* mittels *northern*-Hybridisierung verifiziert werden (Abb. 21, Abb. 22 & Abb. 23).

So zeigt diese Analyse für dunkel gehaltene Keimlinge ebenso die starke Induktion von *RcPIP1-1* in der Elongationszone gegenüber der Zellteilungszone (Faktor  $\sim 1,8$ ; Abb. 21,  $T_D/E_D$ ). Nach Beendigung der Expansionsaktivität durch endogene Faktoren bzw. Lichteinfluss scheint hier jedoch eine leichte Reduzierung des hohen Expressions-Levels aufzutreten (Faktor 1,2 & 1,4; Abb. 21,  $R_D$ ,  $E_L$ ).



Für *RcPIP2-1* lieferte die *northern*-Hybridisierung nahezu identische Ergebnisse wie die Expressionsanalyse mittels der *RT-PCR* (Abb. 22). In der Elongationszone ist das Expressionslevel von *RcPIP2-1* gegenüber der Zellteilungszone um den Faktor  $\sim 1,6$  erhöht (Abb. 22,  $T_D/E_D$ ). Dieses hohe mRNA-Niveau ist im reifen Hypokotyl nach entwicklungsabhängiger

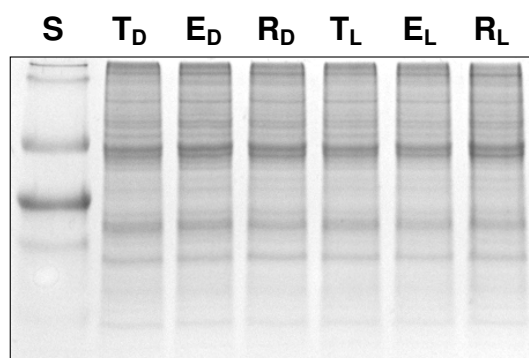


Beendigung der Elongation um das 2,9-fache reduziert (Abb. 22,  $R_D$ ). Die Inhibierung der Elongationsaktivität durch Belichtung geht mit einer Verringerung der *RcPIP2-1*-Expression um den Faktor 2,3 einher (Abb. 22,  $E_L$ ).

Auch für *RcTIP1-1* lieferte die Expressionsanalyse durch *northern*-Hybridisierung vergleichbare Ergebnisse wie die *RT-PCR* (Abb. 23). Die Erhöhung der spezifischen mRNA-Menge von der Zellteilungs- zur Elongationszone, ist auch für *RcTIP1-1* zu erkennen, aber deutlich weniger ausgeprägt als bei *RcPIP2-1* (Faktor 1,2; Abb. 23,  $T_D/E_D$ ). Die Reduktion der *RcTIP1-1*-Transkriptmenge nach Beendigung der Elongation durch endogene Faktoren bzw. Belichtung (Faktor 2,0 bzw. 1,7; Abb. 23,  $R_D/E_L$ ), ist ebenso etwas geringer als bei *RcPIP2-1*.

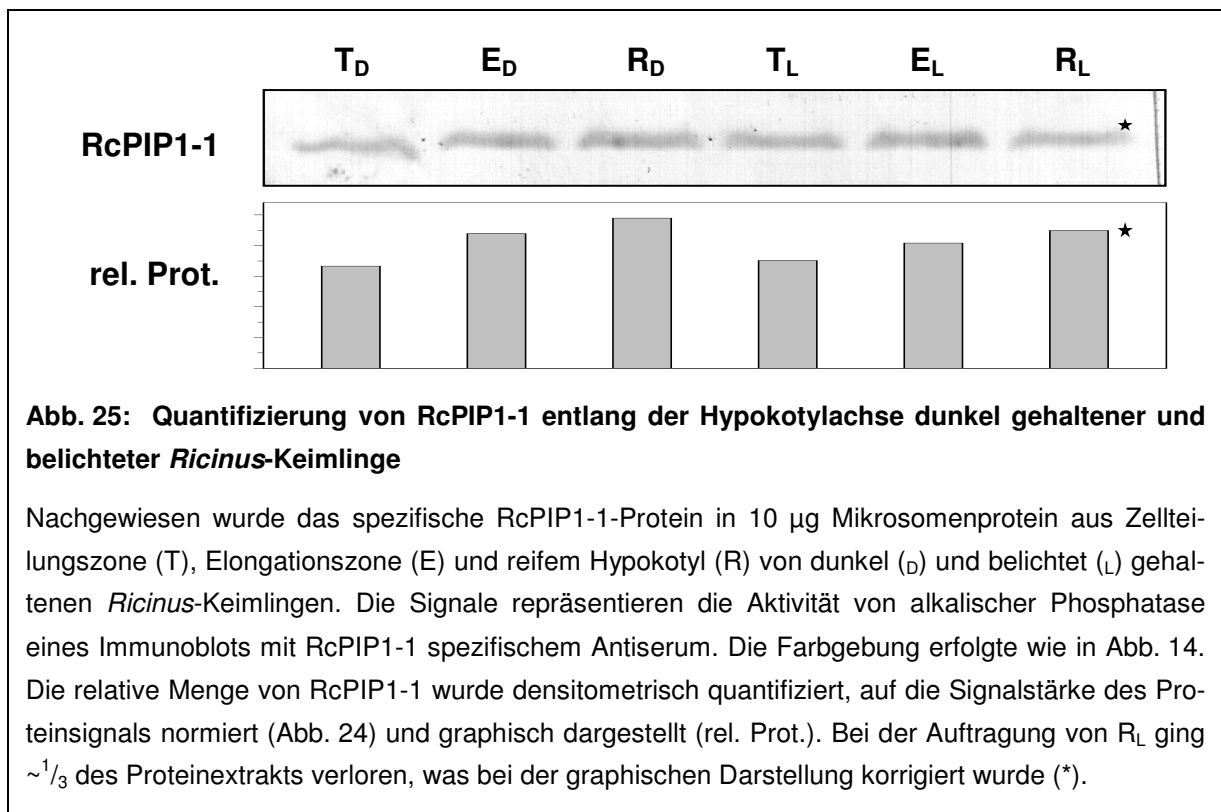
### 3.6.1.2 Auf Proteinebene korreliert nur die Ausprägung von *RcPIP2-1* mit der Elongation des *Ricinus*-Hypokotyls

Eine Expressionsanalyse auf der Basis der Transkriptmenge lässt nur begrenzt Schlüsse über das Maß der Ausprägung eines Gens zu, da dieses posttranskriptionell über die 'Lebensdauer' der mRNA und/oder die Translationsaktivität regulierbar ist. Um eine mögliche Fehleinschätzung zu umgehen bzw. um Hinweise auf mögliche regulatorische Mechanismen zu erhalten, wurde die Expression von *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1*, und *RcTIP1-1* auch auf Proteinebene quantifiziert. Ausgehend von den Transkriptionsanalysen wurde überprüft, inwieweit sich das transiente Auftreten der mRNA während des Elongationsprozesses auch auf Proteinebene niederschlägt. Dazu wurde aus der Zellteilungszone, der Elongationszone, und dem reifen Hypokotyl von dunkel und belichtet gehaltenen *Ricinus*-Keimlingen die mikrosomale Proteinfraction isoliert und der relative Anteil des jeweiligen MIP-Proteins im *immunoblot* ermittelt (Kap. 2.10.2). Da für die verschiedenen Proben gleiche Mengen von Membranprotein aufgetragen wurden, entspricht ein Signal im Immunoblot in gewisser Näherung der relativen Proteinmenge pro Membranfläche, unabhängig von der absoluten Zellgröße. Gefärbtes Mikrosomenprotein in einem repräsentativen Referenzgel belegte die quantitative Vergleichbarkeit der verschiedenen Proben (Abb. 24).



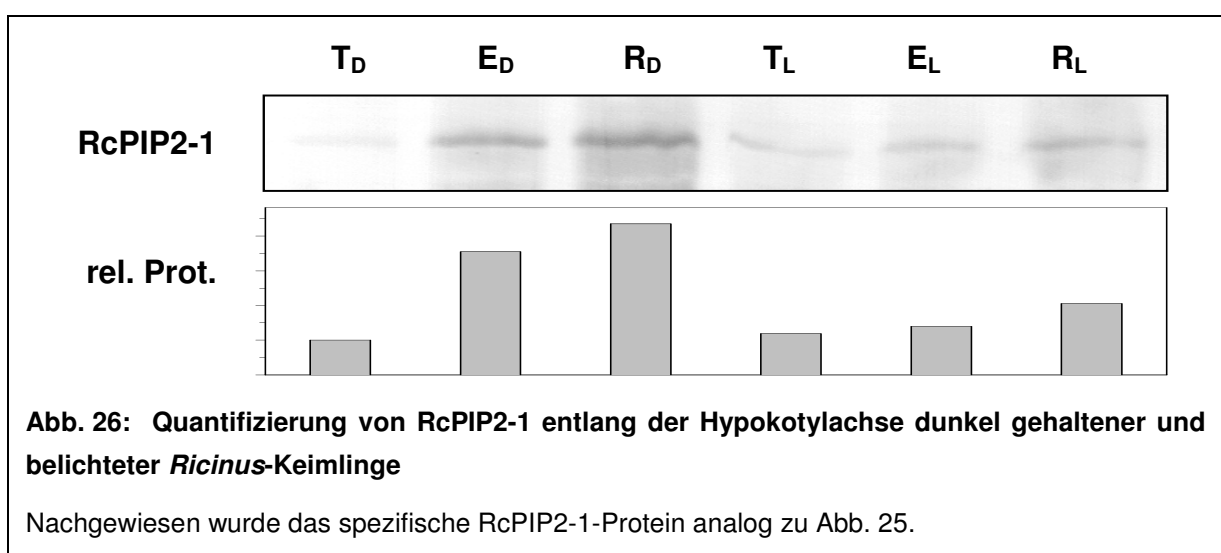
**Abb. 24: Repräsentatives Proteingel für die immunologischen Quantifizierungen**

Analog zu Abb. 25 wurde pro Bahn 18 µg Mikrosomenprotein aus den unterschiedlichen Hypokotylgeweben aufgetragen. Dargestellt ist ein Schwarzweiß-Bild einer Coomassie-Färbung des Gels. Die Banden des Standards (S) repräsentieren (von oben) 250 kD, 148 kD, 60 kD, 42 kD und 30 kD.

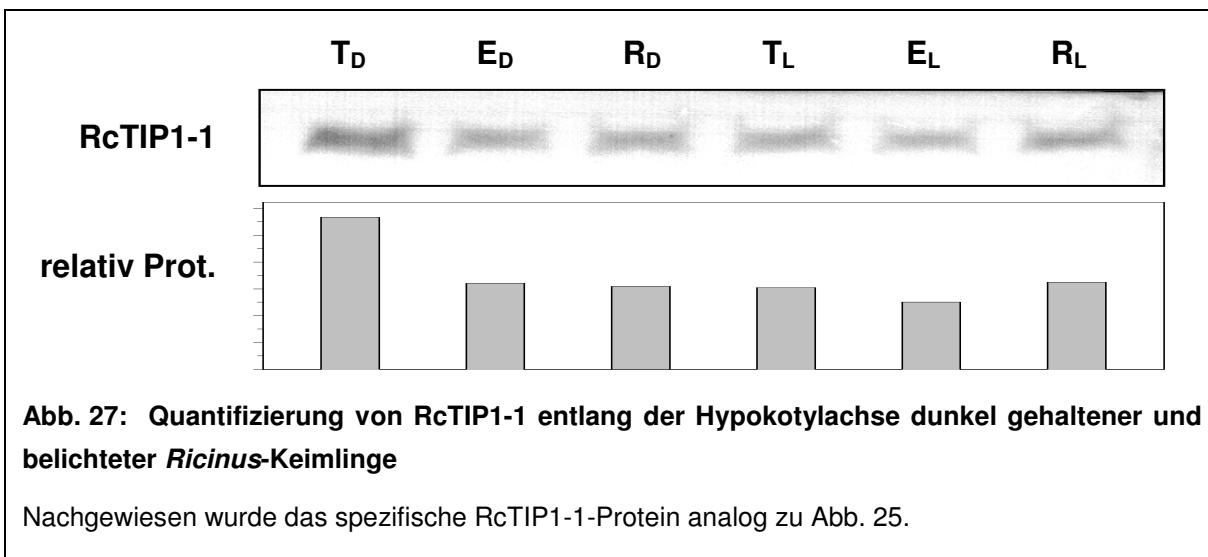


Für *RcPIP1-1* zeigt die Expressionsanalyse auf Basis des spezifischen Proteins nahezu keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Hypokotylzonen dunkel und belichtet gehaltener Keimlinge (Abb. 25). Lediglich ein leichter Anstieg von RcPIP1-1 von der Zone kleiner hin zum Bereich großer Zellvolumina ist erkennbar (Faktor 1,3-1,5; Abb. 25). Dieser Anstieg ist für dunkel gehaltene Keimlinge marginal höher als für belichtete.

In dunkel gehaltenen Keimlingen zeigt *RcPIP2-1*, analog zu den mRNA-Quantifizierungen, auch auf Proteinbasis einen starken Anstieg der Expression in der Elongationszone, verglichen mit der jüngeren Zellteilungszone (Faktor 3,6; Abb. 25, T<sub>D</sub>/E<sub>D</sub>). Im Gegensatz zum Level seines Transkripts scheint das MIP-Protein während der Elongation jedoch weiter zu akkumulieren und erreicht so erst in ausgewachsenen Zellen sein höchstes Level (Abb. 25, R<sub>D</sub>). Nach der Inhibition des Streckungswachstums durch Belichtung ist die



RcPIP2-1-Menge der Elongationszone um den Faktor 2,5 reduziert (Abb. 25,  $E_D/E_L$ ). Ähnlich zu RcPIP1-1 scheint auch RcPIP2-1 in belichteten Keimlingen mit der Zellgröße leicht anzusteigen (Faktor 1,8).



Die relative Menge an RcTIP1-1 zeigt zwischen den verschiedenen Hypokotylabschnitten keine nennenswerten Unterschiede (Abb. 27). Auch scheint sie, im Gegensatz zu den Peptiden der beiden *PIP*, weder in dunkel, noch in belichtet gehaltenen Keimlingen mit der Zellgröße zu korrelieren. Lediglich in der Zellteilungszone von dunkel gehaltenen Keimlingen ist das Level von *RcTIP1-1* um den Faktor von ~1,9 gegenüber dem Niveau der anderen Gewebe erhöht (Abb. 27,  $T_D$ ).

### 3.6.2 Auf zellulärer Ebene zeigen *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* im *Ricinus*-Hypokotyl unterschiedliche Expressionsmuster

Die Expressionsanalyse auf gewebespezifischer Ebene, lässt keine Rückschlüsse auf die zellspezifische Verteilung innerhalb der jeweiligen Hypokotylzonen zu. Daher wurde die Expression von *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* zusätzlich auf zellulärer Ebene lokalisiert.

#### **Abb. 28: (gegenüber liegende Seite) Immunolokalisierung von RcPIP1-1 im Hypokotyl dunkel gehaltener und belichteter *Ricinus*-Keimlinge.**

Detektiert wurde durch spezifische Antikörper in Querschnitten der Zellteilungszone (A), der Elongationszone (D) und des ausdifferenzierten Hypokotyls (E) eines dunkel gehaltenen Keimlings sowie der 'Elongationszone' eines belichteten Keimlings (H). Außerdem in Längsschnitten des Hypokotylhakens von dunkel (B, C) und belichtet gehaltenen Keimlingen (F; G). Als Kontrolle wurden vergleichbare Schnitte des Hypokotyls dunkel gehaltener Keimlinge mit Präimmunserum behandelt (I-M). Vergrößert dargestellt der Kortex der Elongationszone von dunkel ( $D'$ ) und belichtet gehaltenen Keimlingen ( $H'$ ) sowie der Kontrolle ( $L'$ ). Das reduzierte Farbsignal in den faszikulären Geweben ist durch Pfeile markiert (H). Die Farbgebung erfolgte wie in Abb. 14. Die Skalierungsmarken repräsentieren 500  $\mu\text{m}$  (A-M) und 200  $\mu\text{m}$  ( $D'$ ,  $H'$ ,  $L'$ ). Ein durchgestrichener Rahmen zeigt an, dass für entsprechendes Gewebe kein Datenmaterial vorhanden war.





### 3.6.2.1 Die Lokalisation von RcPIP1-1 korreliert nicht mit der Zellexpansion

Die zelluläre Expression von *RcPIP1-1* wurde in den unterschiedlichen Hypokotylzonen auf Proteinebene lokalisiert. Dazu wurden Immunolokalisierungen durchgeführt, in denen das RcPIP1-1-Protein nach Behandlung mit spezifischem Antiserum detektiert wurde (Abb. 28). In sämtlichen Hypokotylzonen tritt RcPIP1-1 gleichmäßig in allen Zellen des Kortex und im Mark auf. Dabei zeigen sich keine Unterschiede zwischen Zonen mit starker Elongationsaktivität (Abb. 28, D) und Zonen, in denen kein Volumenwachstum stattfindet (Abb. 28, E, H). Dies stimmt im Wesentlichen mit den Befunden der gewebespezifischen Lokalisierung von RcPIP1-1 überein (Abb. 25). Keinerlei RcPIP1-1 scheint in den kleinen Zellen des Xylemparenchyms und dem präkambialen Gewebe vorhanden zu sein (Abb. 28, H' [Pfeil]). Dieses Phänomen zeigt sich unabhängig von der Expansionsaktivität in allen untersuchten Zonen und steht im Kontrast zur Lokalisation der beiden anderen untersuchten MIP (siehe Abb. 30, Abb. 32). In Schnitten, die mit Präimmunserum behandelt wurden, zeigt das fast völlige Fehlen von Signal die Spezifität des verwendeten Antiserums an. Es tritt jedoch eine unspezifische Färbung in den Idioblasten auf (Abb. 28, I-M).

### 3.6.2.2 *RcPIP2-1* ist verstärkt in der Peripherie und dem lebenden Xylem des elongierenden Hypokotyls exprimiert

Die zelluläre Expression von *RcPIP2-1* wurde in den unterschiedlichen Hypokotylzonen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene lokalisiert. In Dünnschnitten wurde im ersten Fall die *RcPIP2-1*-spezifische mRNA durch *in situ*-Hybridisierung (Abb. 29), im zweiten Fall das RcPIP2-1-Protein nach Behandlung mit affinitätsgereinigten Antikörpern nachgewiesen (Abb. 30).

Auf mRNA-Ebene tritt die höchste Expression von *RcPIP2-1* in den peripheren Kortexzellen und der Epidermis der Elongationszone dunkel gehaltener Keimlinge auf (Abb. 29, D, D').

#### **Abb. 29: (gegenüberliegende Seite) Lokalisierung von *RcPIP2-1* im Hypokotyl dunkel gehaltener und belichteter *Ricinus*-Keimlinge mittels *in situ*-Hybridisierung**

Detektiert wurden *RcPIP2-1*-Transkripte durch spezifische *antisense*-RNA-Sonden in Querschnitten der Zellteilungszone (A), der Elongationszone (D) und des ausdifferenzierten Hypokotyls (E) sowie der entsprechenden Zonen belichteter Keimlinge (F, I, J). Außerdem in Längsschnitten des Hypokotylhakens von dunkel (B, C) und belichtet gehaltenen Keimlingen (G, H). Als Kontrolle wurden vergleichbare Schnitte des Hypokotylhakens und der Elongationszone dunkel gehaltener Keimlinge mit *sense*-RNA-Sonden behandelt (K, L, M). Vergrößert dargestellt sind die peripheren Zellschichten der Außenseite des Hypokotylhakens von dunkel (C') und belichtet (H') gehaltenen Keimlingen sowie der Kontrolle (L'). Ebenso die Außenseite der Elongationszone für beide Behandlungen (D', I') und der Kontrolle (M'). Die Richtung Elongationszone zunehmende Farbsignal auf der Außenseite des Hypokotylhakens dunkel gehaltener Keimlinge ist durch Pfeile markiert (C). Die Farbgebung erfolgte wie in Abb. 14. Die Skalierungsmarken repräsentieren 500 µm (A-M), 250 µm (C', H', L') und 250 µm (D', I', M'). Ein durchgestrichener Rahmen zeigt an, dass für entsprechendes Gewebe kein Datenmaterial vorhanden war.



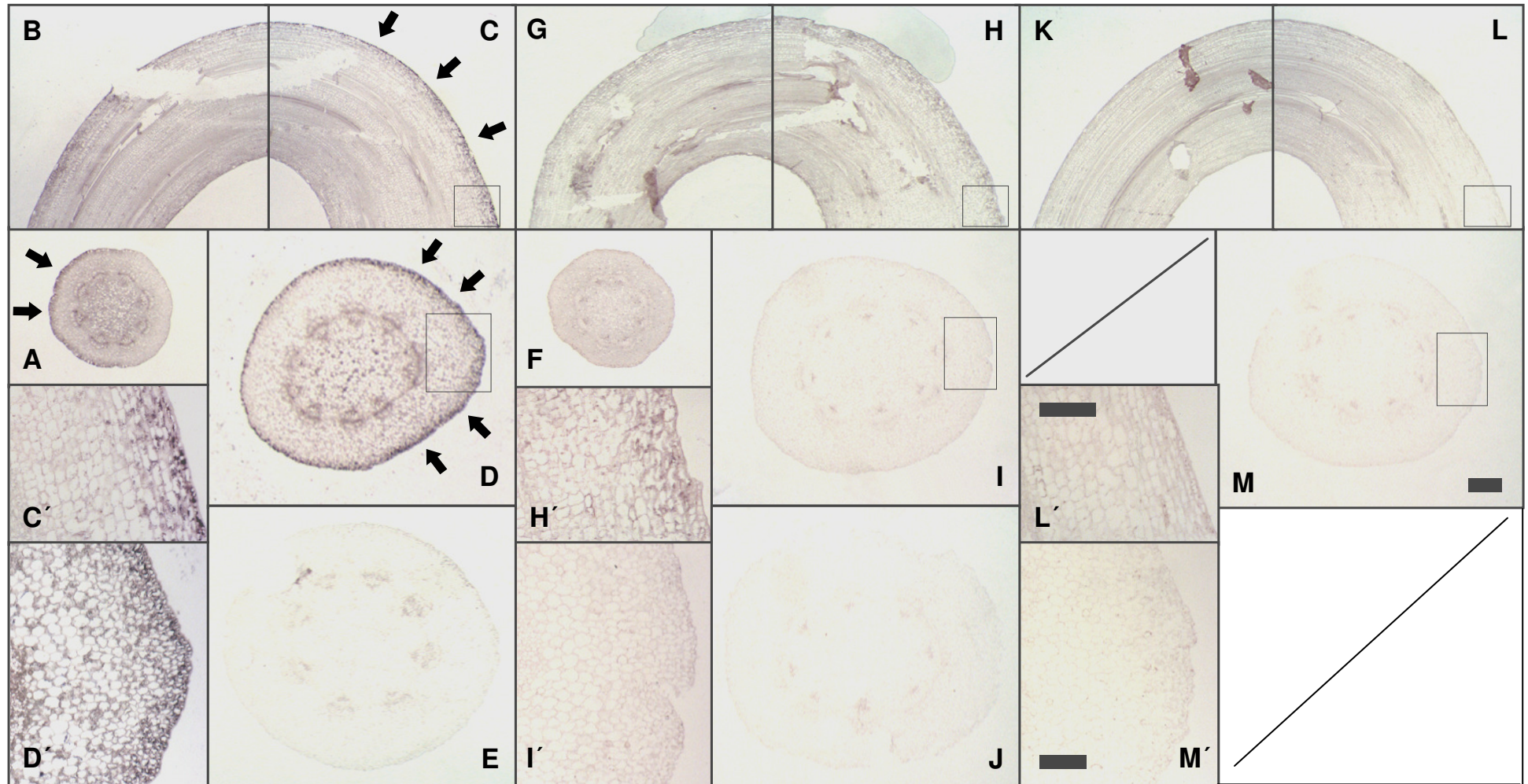
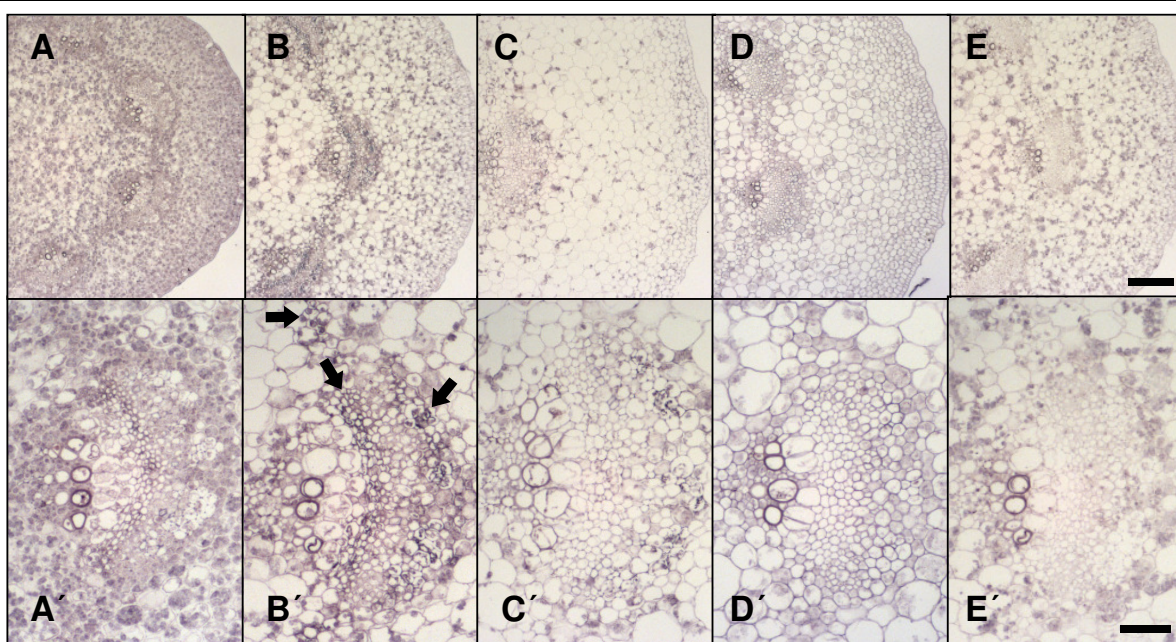


Abb. 29: Lokalisierung von *RcPIP2-1* im Hypokotyl dunkel gehaltener und belichteter *Ricinus*-Keimlinge mittels *in-situ* Hybridisierung (Legende, siehe gegenüberliegende Seite)

Dabei fällt ein asymmetrisches Expressionsmuster auf, wobei in der äußeren Seite (relativ zur Krümmung des Hypokotyls) ein besonders starkes Farbsignal auftritt (Pfeile). Die starke Expression in diesem Bereich setzt sich auch im basalen Teil des Hypokotylhakens fort, nimmt jedoch in apikaler Richtung stetig ab (Abb. 29, C, C', Pfeile). In den nicht-elongierenden Zellen der Innenseite des Hypokotylhakens scheint *RcPIP2-1* nur sehr gering exprimiert zu sein. In der Außenseite der Zellteilungszone zeigt ein relativ schwaches Signal nur noch in den epi- und hypodermalen Zellschichten eine verhältnismäßig geringe Expression von *RcPIP2-1* an (Abb. 29, A, Pfeile). Zusätzlich dazu tritt eine schwächere Färbung im Parenchym und innerhalb der Leitbündel der Zellteilungs- und Elongationszone auf (Abb. 29, A, D'). In ausdifferenziertem Hypokotyl zeigt ein relativ schwaches Signal noch eine marginale Expression von *RcPIP2-1* an (Abb. 29, E). Im Hypokotyl belichteter Keimlinge scheint *RcPIP2-1* sowohl in Leitbündeln, im Parenchym als auch in der Epidermis nur wenig exprimiert zu sein (Abb. 29, F-J). Hier ist die Stärke des Signals nur geringfügig höher als in der Kontrolle, für die vergleichbare Schnitte vom Hypokotyl dunkel gehaltener Keimlinge mit *sense*-Sonden behandelt wurden (Abb. 29, K-M). Die Lokalisation der *RcPIP2-1*-Expression mittels *in situ*-Hybridisierung korreliert sehr gut mit den Expressionsanalysen in den ver-



**Abb. 30: Immunolokalisierung von *RcPIP2-1* in den verschiedenen Zonen des *Ricinus*-hypokotyls**

Detektiert wurde durch spezifische Antikörper in Querschnitten der Zellteilungszone (A), der Elongationszone (B) und des ausdifferenzierten Hypokotyls (C) eines dunkel gehaltenen Keimlings sowie der Elongationszone eines belichteten Keimlings (D). Vergrößert dargestellt ist ein Leitbündel aus den jeweiligen Zonen (A'-D'). Als Kontrolle wurde ein vergleichbarer Querschnitt der Elongationszone dunkel gehaltener Keimlinge mit Peptid-gesättigtem Antikörper behandelt (E, E'). Das starke Farbsignal in den (inter-)faszikulären Geweben der Elongationszone ist durch Pfeile markiert (B'). Die Farbgebung erfolgte wie in Abb. 14. Die Skalierungsmarken repräsentieren 300 µm (A-E) und 100 µm (A'-E').



schiedenen Zonen entlang der Hypokotylachse (Kap. 3.6.1.1). Hier zeigt ebenso die Elongationszone dunkel gehaltener Keimlinge die weitaus stärkste Expression. Darüber hinaus konnte bestätigt werden, dass bei dunkel gehaltenen Keimlingen die Expression in der Zellteilungszone etwas höher ist als im reifen Hypokotyl bzw. in den Geweben belichteter Keimlinge (Abb. 29, A).

Auf Proteinebene zeigt sich eine besonders starke, RcPIP2-1-spezifische Färbung im Protophloem, in den kleinen Zellen des Xylemparenchyms und in interfazikulärem Gewebe der Elongationszone dunkel gehaltener Keimlinge (Abb. 30, B, B' [Pfeile]). Mit dieser Intensität tritt das Farbsignal in keiner anderen Hypokotylzone auf. So ist sie in der 'Elongationszone' belichteter Keimlinge vollständig unterdrückt (Abb. 30, D, D'). Deutlich verringert tritt sie nur im Protophloem von ausdifferenziertem Hypokotyl (Abb. 30, C') bzw. in den kleinen Zellen des Xylemparenchyms der Zellteilungszone auf (Abb. 30, A'). Das starke Farbsignal im Leitbündelring der Elongationszone verschwindet bei der Kontrollbehandlung mit Peptid-gesättigtem Antikörper vollständig (Abb. 30, E, E') und kann somit als spezifisch für RcPIP2-1-Protein angesehen werden. Lediglich im Parenchym scheint unspezifische Färbung aufzutreten und überlagert möglicherweise dort vorkommendes spezifisches Signal (Abb. 30, E). Daher kann auf Proteinebene nicht gezeigt werden, ob eine verstärkte Expression des *RcPIP2-1* in der Kortexperipherie auftritt (vgl. Abb. 29).

Die Befunde der Immunolokalisierung des RcPIP2-1 stimmen im Wesentlichen mit der gewebespezifischen Analyse überein (Abb. 26). Lediglich die starke Akkumulation im ausdifferenziertem Hypokotyl dunkel gehaltener Keimlinge kann auf zellulärer Ebene nicht veranschaulicht werden (Abb. 30, C, C').

### **3.6.2.3 RcTIP1-1 ist im Metaxylem lokalisiert und scheint im Parenchym zum Beginn der Elongation reduziert zu werden**

Auch die zelluläre Expression von RcTIP1-1 wurde in den unterschiedlichen Hypokotylzonen auf Proteinebene lokalisiert. Dazu wurden wiederum Immunolokalisierungen durchgeführt, in denen das RcTIP1-1-Protein nach Behandlung mit spezifischem Antiserum detektiert wurde (Abb. 31).

In allen Bereichen des Hypokotyls belichteter sowie dunkel gehaltener Keimlinge tritt ein mäßig starkes Signal in Kortex und im Mark sowie ein starkes Signal im Leitbündelring auf (Abb. 31, A-I). Eine Ausnahme bilden die elongierenden Kortexzellen auf der Außenseite des Hypokotylhakens dunkel gehaltener Keimlinge, wo die Färbung gegenüber dem Mark und dem Kortex im Innern des Hypokotylhakens deutlich reduziert ist (Abb. 31, C, Pfeile; C'). Im Hypokotyl belichteter Keimlinge scheint diese lokale Reduktion von RcTIP1-1 aufgehoben zu sein. Hier zeigt RcTIP1-1 ein über den ganzen Hypokotylhaken gleichmäßig verteiltes Ausprägungsmuster (Abb. 31, G, H'). Zwischen der Zone stark expandierender Zellen und den Bereichen ohne Elongationsaktivität sind keine nennenswerten Unterschiede der Farbsignalarbeit auszumachen (Abb. 31, C & D, H & I). Das eindeutig stärkste Signal tritt in der Zellteilungszone dunkel gehaltener Keimlinge in Kortex, im Mark und v. a. im Leitbündelring auf (Abb. 31, A). Somit korrelieren auch die Ergebnisse der Immunolokalisierung von RcTIP1-1

**Abb. 31: (gegenüberliegende Seite) Immunolokalisierung von RcTIP1-1 im Hypokotyl dunkel gehaltener und belichteter *Ricinus*-Keimlinge**

Detektiert wurde durch spezifische Antikörper in Querschnitten der Zellteilungszone (A), der Elongationszone (D) und des ausdifferenzierten Hypokotyls (E) von dunkel gehaltenen Keimlingen sowie den entsprechenden Zonen belichteter Keimlinge (F, I, J). Außerdem in Längsschnitten des Hypokotylhakens von dunkel (B, C) und belichtet gehaltenen Keimlingen (G, H). Als Kontrolle wurden vergleichbare Schnitte des Hypokotyls dunkel gehaltener Keimlinge mit Präimmunserum behandelt (K-O). Vergrößert dargestellt sind die äußeren Zellschichten des Hypokotylhakens von dunkel (C') und belichtet gehaltenen Keimlingen (H') sowie der Kontrolle (M'). Ebenso der Kortex der Außenseite der 'Elongationszone' beider Behandlungen (D', I') und der Kontrolle (N'). Das reduzierte Farbsignal im äußeren Kortex des Hypokotylhakens ist durch Pfeile markiert (B, C). Die Farbgebung erfolgte wie in Abb. 14. Die Skalierungsmarken repräsentieren 500 µm (A-L), 200 µm (C', G', K') und 200 µm (B', F', J').

sehr gut mit dem Befund der Expressionsanalyse auf Proteinebene in den verschiedenen Zonen entlang der Hypokotylachse (Kap. 3.6.1.2). Wiederum zeigt in Schnitten, die mit Präimmunserum behandelt wurden, das völlige Fehlen von Farbsignal die Spezifität des verwendeten Antikörpers an (Abb. 31, K-O).

Eine detailliertere Analyse der RcTIP1-1-Lokalisation innerhalb eines Leitbündels der Zellteilungszone dunkel gehaltener Keimlinge ist in Abb. 32 dargestellt. Um die Färbung innerhalb eines Leitbündels den unterschiedlichen, faszikulären Geweben zweifelsfrei zuordnen zu können, wurden vergleichbare Dünnschnitte mit Lugol'scher Lösung und Anilinblau behandelt. In ersterem Fall lässt sich durch die Anfärbung der stärkehaltigen Leitbündelscheide bzw. des Parenchyms das Leitbündel eindeutig von umgebendem Gewebe abgrenzen (Abb. 32, D). Durch das zweite Färbeexperiment war es möglich die Kalloseauflagerungen der Siebplatten unter UV-Licht sichtbar zu machen, und somit den Bereich des Phloems zu identifizieren (Abb. 32, B, obere Pfeile). Darüber hinaus zeigte unter UV-Licht eine Fluoreszenz der lignifizierten Zellwände der Tracheen die Lage des Xylems an (Abb. 32, B, untere Pfeile; B').

**Abb. 32: (übernächste Seite) Immunolokalisierung von RcTIP1-1 in einem Leitbündel der Zellteilungszone eines dunkel gehaltenen *Ricinus*-Keimlings**

Gezeigt ist ein Quer- (A) und Längsschnitt (A') nach Behandlung mit RcTIP1-1-spezifischen Antikörpern. Als Kontrolle wurden vergleichbare Schnitte mit Antikörpern behandelt, die mit dem spezifischen Peptid vorinkubiert worden waren (C, C'). Die Farbgebung erfolgte wie in Abb. 14. Zur Identifikation der Phloem- und Xylembereiche wurde ein vergleichbarer Dünnschnitt mit Anilinblau angefärbt, und unter UV Licht aufgenommen (B). B') stellt eine UV-Aufnahme von A') ohne vorhergehende Anilinblau-Färbung dar. D) Stärkenachweis durch Färbung mit Lugol'scher Lösung in einem vergleichbaren Dünnschnitt. In A) sind starke Signale in den großen Xylemgefäßen, dem Xylemparenchym und dem Metaphloem markiert, in B) die Fluoreszenz der Kallose und lignifizierten Tracheen (\*). Die Skalierungsmarken repräsentieren je 100 µm (A, B, C bzw. A', B', C').



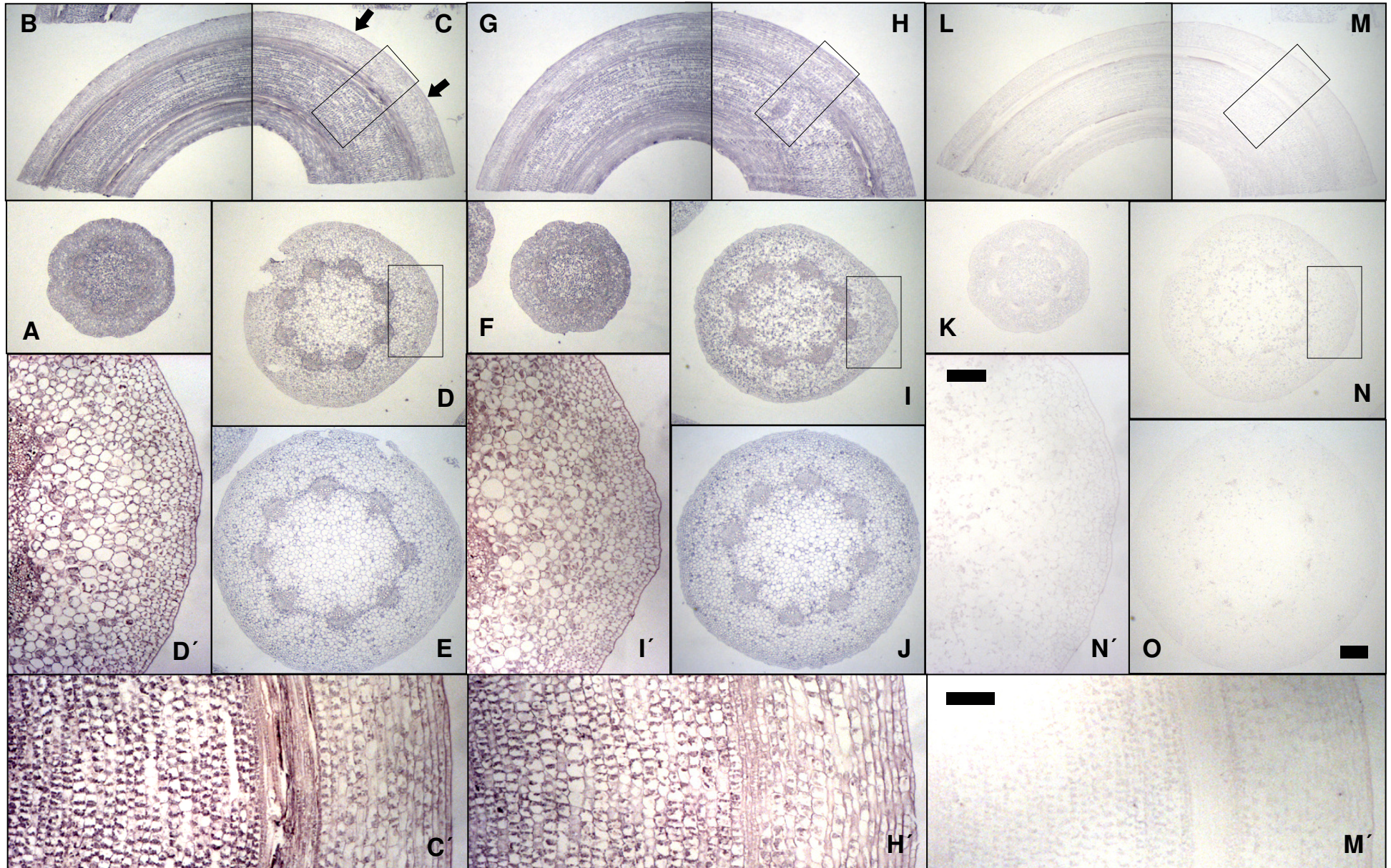
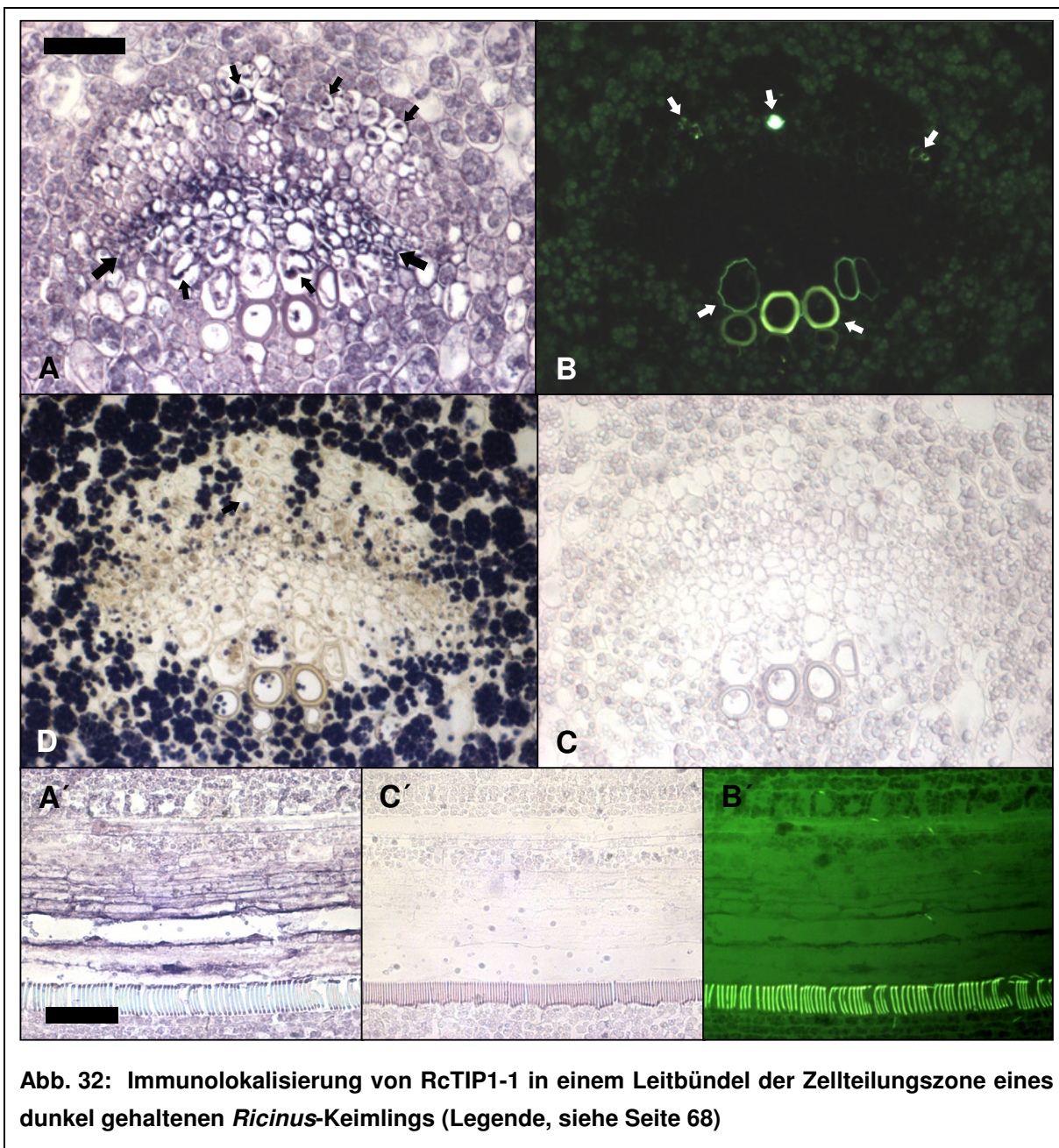


Abb. 31: Immunolokalisierung von RcTIP1-1 im Hypokotyl dunkel gehaltener und belichteter *Ricinus*-Keimlinge (Legende, siehe gegenüberliegende Seite)





Aus einem Vergleich der verschiedenen Anfärbungen wurde deutlich, dass RcTIP1-1 hauptsächlich im Parenchym des Metaxylems lokalisiert ist (Abb. 32, A, gr. Pfeile). Darüber hinaus tritt es stark in den Protoplasten großer Xylemgefäße auf (Abb. 32, A, untere kl. Pfeile; A'), wo keine oder nur eine marginale Lignifizierung der Zellwände nachzuweisen ist (Abb. 32, B). Außerdem scheint RcTIP1-1 verstärkt im stärkefreien Protophloem vorzukommen (Abb. 32, A, obere kl. Pfeile). Diese Bereiche haben eine Leitgewebe-ähnliche Anatomie (Abb. 32, C') und werden von schmalen Gruppen stärkehaltiger Zellen durchzogen (Abb. 32, D).

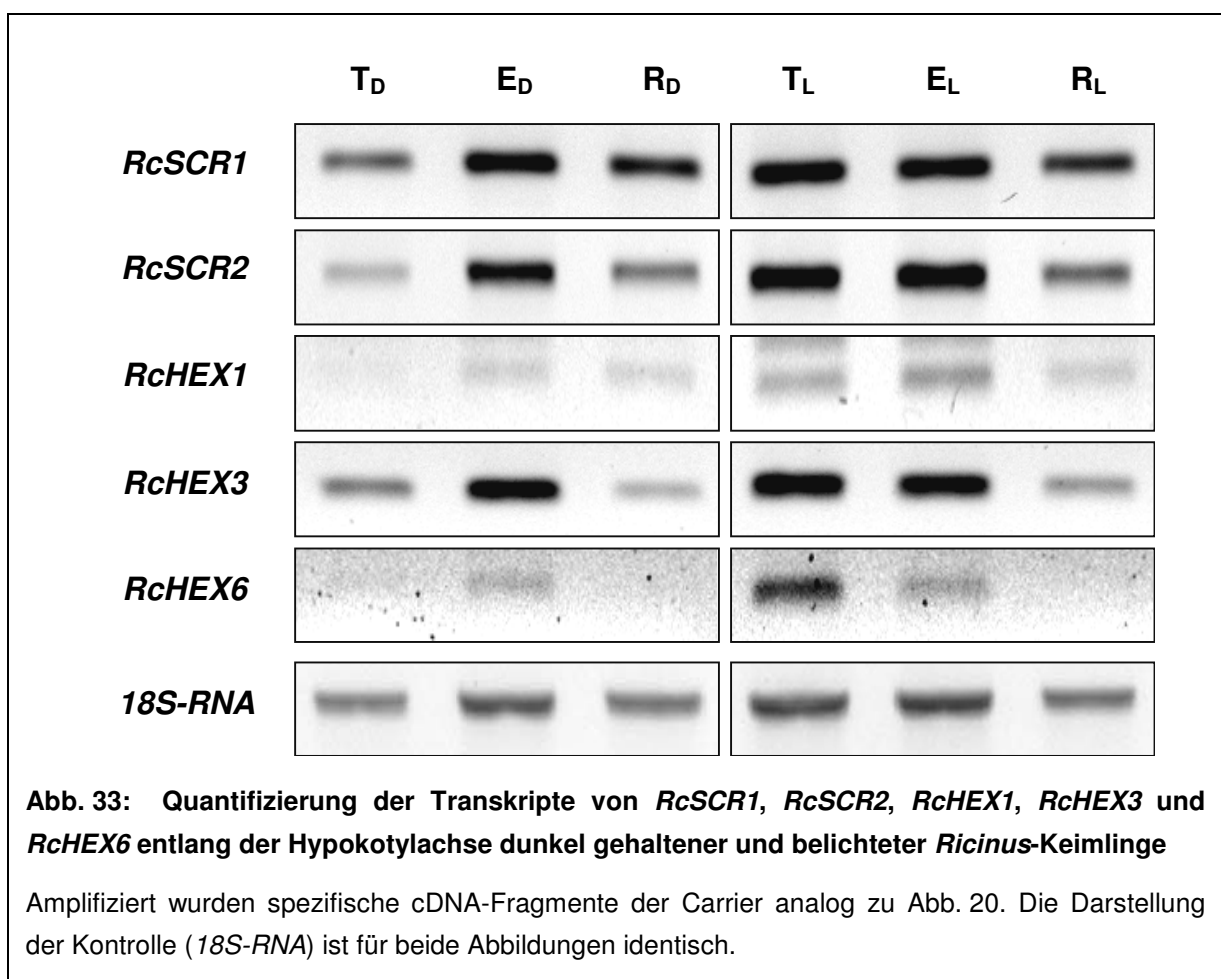
Zum Nachweis der Signalspezifität wurden vergleichbare Dünnschnitte mit aufgereinigten Antikörpern behandelt, welche mit ihrem spezifischen Peptid vorinkubiert worden waren. Hier beweist ein vollständiges Fehlen des Färbesignals wiederum die Spezifität der Antikörperbindung (Abb. 32, C, C').

### 3.7 Die Expression von Zuckertransportern korreliert mit der Elongationsaktivität des *Ricinus*-Hypokotyls

Die meisten pflanzlichen Zuckertransporter katalysieren die Aufnahme von osmotisch aktiven Mono- und Disacchariden in Pflanzenzellen und stellen somit eine weitere, potentielle molekulare Grundlage für das Expansionswachstum pflanzlicher Zellen dar (siehe Kap. 1.3). Vor diesem Hintergrund wurde, analog zu den drei *MIP* (Kap. 3.6.1.1), die Expression der Zuckercarrier *RcSCR1* und *RcSCR2* sowie *RcHEX1*, *RcHEX3* und *RcHEX6* auf RNA-Ebene entlang des Hypokotyls quantifiziert. Außerdem wurde die Lokalisation eines gut charakterisierten Vertreters der Zuckertransporter (Weig & Komor, 1996), des Saccharosecarriers *RcSCR1*, auf zellulärer Ebene ermittelt.

#### 3.7.1 Entlang des Hypokotyls zeigen Saccharose- und Hexosecarrier eine transiente Expressionssteigerung

Die Expression der Zuckercarrier in den unterschiedlichen Zonen entlang der Hypokotylachse wurde durch Quantifizierung der spezifischen Transkripte mittels *RT-PCR* analysiert. Analog zur Quantifizierung der *MIP*-Aktivitäten wurde diese Expressionsanalyse für dunkel und belichtet gehaltene Keimlinge durchgeführt (Abb. 33).



In dunkel gehaltenen Keimlingen zeigen alle untersuchten *Carrier* in der Elongationszone verglichen mit der Zellteilungszone eine deutlich gesteigerte Ausprägung (Abb. 33, E<sub>D</sub>), welche wieder reduziert, wenn die Elongation im reifen Hypokotyl zum Erliegen kommt (Abb. 33, R<sub>D</sub>). Diese transiente Expression ist für den *RcSCR1* und *RcHEX1* wenig ausgeprägt und könnte innerhalb des Schwankungsbereichs der Kontrolle liegen (Abb. 33, 18S-RNA). Nach Belichtung scheinen alle *Carrier* auch in der Zellteilungszone induziert zu werden, was zu einem Muster hoher Expression im oberen (Abb. 33, T<sub>L</sub>, E<sub>L</sub>) und geringer Expression im basalen Hypokotyl führt (Abb. 33, R<sub>L</sub>). Insbesondere das Expressionsmuster von *RcHEX6* gleicht stark dem des *RcPIP2-1* (Abb. 20). Nur die Abnahme des mRNA-Levels in der Elongationszone nach Belichtung zeigt sich hier weniger deutlich (Abb. 33, E<sub>D</sub>/E<sub>L</sub>).

### 3.7.2 *RcSCR1* ist stark in Geleitzellen und Idioplasten des Hypokotyls exprimiert

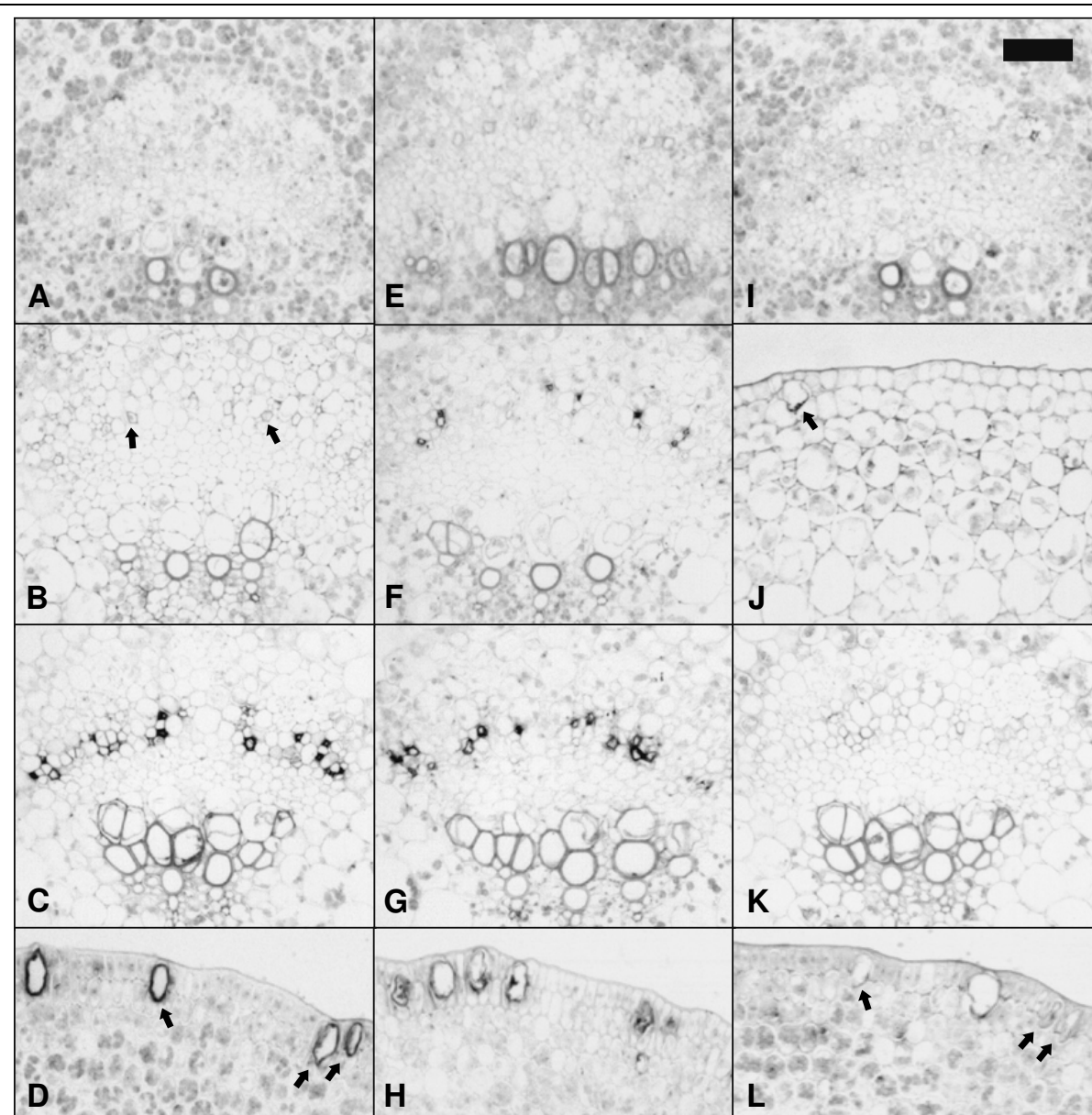
Um detaillierte Kenntnisse über die zelluläre Lokalisation der *RcSCR1*-Aktivität innerhalb der verschiedenen Hypokotylzonen zu erhalten, wurden Immunolokalisierungen in Dünnschnitten durchgeführt (Abb. 34).

Es zeigt sich, dass der *RcSCR1* besonders stark in einzelnen Zellen des Metaphloems exprimiert ist (Abb. 34). Diese zellspezifische Expression tritt in stark elongierendem Gewebe nicht auf. Deutlich induziert ist sie dagegen in ausdifferenziertem Gewebe (Abb. 34, C, G) bzw. in Gewebe, dessen Expansionswachstum durch Licht inhibiert wurde (Abb. 34, F). Auch im Phloem der Zellteilungszone scheint *RcSCR1* nicht ausgeprägt zu werden (Abb. 34, A, E). In dunkel wie belichtet gehaltenen Keimlingen tritt zusätzlich ein starkes Signal in den großen, epidermalen Idioplasten der Zellteilungszone auf (Abb. 34, D, Pfeile). Mit dem geringeren Vorkommen dieser Idioplasten in der Epidermis der unteren Hypokotylbereiche, scheint auch *RcSCR1*-spezifische Färbung reduziert zu sein (Abb. 34, J, Pfeil). In der Kontrolle mit Präimmunserum belegt das Fehlen von Farbsignal die Spezifität der nachgewiesenen Antikörperbindung (Abb. 34, I, K, L). Neben den zwei beschriebenen Zelltypen scheint *RcSCR1* in keinen weiteren Zellen des Hypokotyls exprimiert zu sein, was gleichermaßen für dunkel gehaltene und belichtete Keimlinge zutrifft (Abb. 34, A-H).

#### **Abb. 34: (gegenüberliegende Seite) Immunolokalisierung von *RcSCR1* im Hypokotyl von dunkel gehaltenen und belichteten *Ricinus*-Keimlingen**

Gezeigt sind Querschnitte durch Leitbündel der drei Hypokotylzonen dunkel gehaltener (A, B, C) und belichteter Keimlinge (E, F, G) nach Behandlung mit *RcSCR1*-spezifischen Antikörpern. Außerdem Querschnitte durch die Peripherie des Kortex der Zellteilungs- (D) und Elongationszone dunkel gehaltener Keimlinge (J) sowie der Zellteilungszone belichteter Keimlinge (H). Als Kontrolle wurden vergleichbare Schnitte mit Präimmunserum behandelt (I, K, L). In B sind marginale Signale im Bereich des Phloems markiert, in D und J große Idioplasten der Epidermis die in der Kontrolle keinerlei Signal zeigen (L, \*). Die Detektion wurde analog zu Abb. 29 durchgeführt. Die Skalierungsmarke repräsentiert 100 µm (A-L).



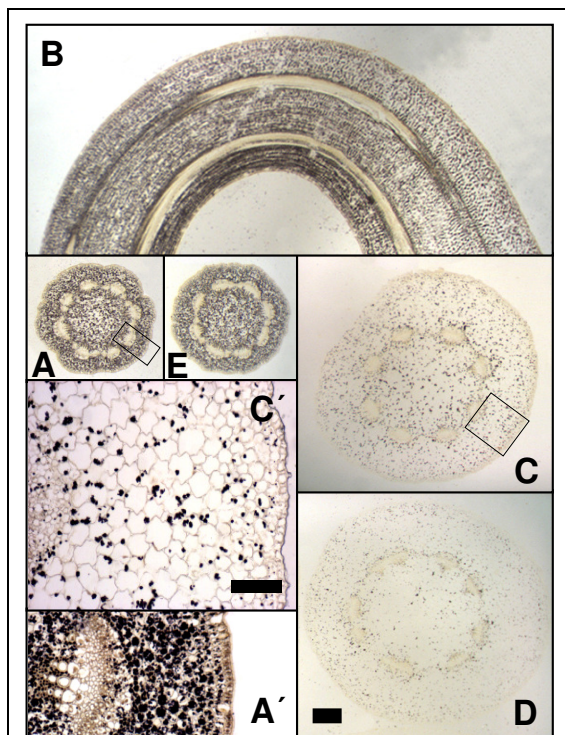


**Abb. 34:** Immunolokalisierung von RcSCR1 im Hypokotyl von dunkel gehaltenen und belichteten *Ricinus*-Keimlingen (Legende, siehe gegenüberliegende Seite)

### 3.8 Entlang der Hypokotylachse korreliert der Gehalt an Stärkekörnern indirekt proportional mit der Zellgröße

Als Speicher für energiereiche Assimilate könnte auch die Stärke im *Ricinus*-Hypokotyl in den Prozess der Elongation involviert sein (Kap. 1.4). Um einen Überblick über die Verteilung dieser Speicherstärke in den verschiedenen Zonen entlang des Hypokotyls zu erhalten, wurden wiederum Dünnschnitte von Hypokotylgewebe angefertigt, und mit Lugol'scher Lösung behandelt (Abb. 35).

Es zeigt sich deutlich, dass der Leitbündelring nahezu frei von Stärke ist (Abb. 35, A-E). Lediglich in den Bereich des Protophloems und zwischen die Gefäße des Protoxylems sind schmale Gruppen stärkehaltiger Zellen eingestreut (Abb. 35, A'). Alle anderen Zellen von



**Abb. 35: Lokalisierung von Stärke im Hypokotyl von *Ricinus*-Keimlingen**

Gezeigt sind Querschnitte durch die Zellteilungs-, Elongations- und die ausdifferenzierte Zone von dunkel gehaltenen Keimlingen (A, C, D), sowie der Zellteilungszone belichteter Keimlinge (E). Außerdem ein Längsschnitt durch den Hypokotylhaken dunkel gehaltener Keimlinge (B) und vergrößerte Ausschnitte aus C' und A'. Gefärbt wurde mit Lugol'scher Lösung, die Skalierungsmarken repräsentieren 500  $\mu\text{m}$  (A-E) und 200  $\mu\text{m}$  (C', A').

Kortex und Mark weisen zahlreiche Stärkekörner auf (Abb. 35, A, B, E). Deren Menge hat in der Zellteilungszone ihr Maximum (Abb. 35, A, E) und nimmt in Richtung der basalen Hypokotylbereiche kontinuierlich ab (Abb. 35, B, C). In ausdifferenziertem Hypokotyl ist nahezu keine Stärke mehr detektierbar (Abb. 35, D). Ein radiärer Gradient in der Verteilung der Stärkekörner ist in keiner Hypokotylzone zu erkennen (Abb. 35, A, C', D). Zwischen den dunkel und belichtet gehaltenen Keimlingen ist sowohl in der Zellteilungszone (Abb. 35, A, E) als auch in den anderen Hypokotylzonen (Daten nicht gezeigt) kein augenscheinlicher Unterschied des Stärkegehaltes zu erkennen.

---

## 4 Diskussion

Pflanzen besitzen mit den Aquaporinen eine hohe Kapazität, in kurzer Zeit große Mengen Wasser über zelluläre Membran auszutauschen und diesen Austausch effektiv zu regulieren (vgl. Siefritz et al., 2002; Johansson et al., 2000). Bisher ist nicht vollständig geklärt, für welche physiologischen Prozesse diese hohe Wasseraustauschkapazität relevant ist. Ein physiologischer Vorgang, der mit einem schnellen Transport von Wasser über Zellmembranen einhergeht, ist das pflanzliche Volumenwachstum. Gerade Zellen expandierender Gewebe weisen besonders hohe Wasserleitfähigkeiten auf (z. B.: Cosgrove & Steudle, 1981; Steudle & Boyer, 1985; Morillon & Lassalles, 1999). Damit in Zusammenhang scheint die Expression verschiedener Aquaporine zu stehen (Ludevid et al., 1992; Hanzawa et al., 1997; Higuchi et al., 1998; Weig & Eisenbarth, 2000; O' Brien et al., 2002).

Das Hypokotyl des *Ricinus*-Keimlings diente als definiertes Modell zum Studium des pflanzlichen Streckungswachstums, welches sich als zeitliche Abfolge eines endogenen zellulären Entwicklungsprogramms darstellt. Dieses Entwicklungsprogramm ist dem Einfluss von Licht als exogenes Signal unterworfen (Abb. 5). Dabei wurde als adäquater Reiz für die Wachstumshemmung Licht der Wellenlänge von 660 nm identifiziert (Abb. 7). Dies lässt den Schluss zu, dass auch die Photomorphogenese und somit die Inhibition des Expansionswachstums des *Ricinus*-Hypokotyls, maßgeblich unter der Kontrolle des pflanzlichen Phytochromsystems steht (Mohr & Ziegler, 1969; Reed et al., 1993). Aufgrund dieser Voraussetzungen lag mit dem Hypokotyl von 7-8 Tage alten *Ricinus*-Keimlingen ein Modellsystem vor, in dem folgende Entwicklungsstadien pflanzlicher Zellen untersucht werden konnten:

- Zellteilungsstadium ohne Expansionsaktivität (Zellteilungszone)
- Stadium der Zellexpansion ohne Teilungsaktivität (Elongationszone)
- Reifestadium ohne Expansions- und Teilungsaktivität (basales Hypokotyl)
- Stadium inhibierter Elongation ohne Expansions- und Teilungsaktivität (ehemals elongierende Zone nach Belichtung)

Da während des Hypokotylwachstums keine ausgeprägten morphologischen Veränderungen auftreten (z. B. Verzweigung), war die Zuordnung der Befunde zu den einzelnen Stadien des Elongationswachstums möglich.

Anhand des verwendeten Keimlingmodells wurde herausgefunden, inwieweit die Wasserleitfähigkeit und andere biophysikalische Parameter des zellulären Wasserhaushalts die funktionelle Grundlage des pflanzlichen Streckungswachstums darstellen, bzw. an dessen Regulation beteiligt sein können. Weiterführend wurde herausgearbeitet, dass den Aquaporinen als molekulare Komponente im Zuge der Wachstumsregulation eine besondere Bedeutung zukommen kann.

## **4.1 Die Wasserleitfähigkeit von Membranen stellt eine regulative Komponente für pflanzliches Streckungswachstum dar**

Die Schwellungstests mit Protoplasten und Vakuolen lieferten schnell und einfach erste Hinweise auf eine physiologische Relevanz der zellulären Wasserleitfähigkeit während des Elongationswachstums des *Ricinus*-Hypokotyls. Dabei war es jedoch nicht möglich, die erhobenen Daten einer räumlichen Verteilung innerhalb einzelner Hypokotylzonen zuzuordnen. Außerdem konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Isolationsprozedur die wasserleitenden Eigenschaften der untersuchten Membransysteme beeinflusste. Daher wurde mittels der Zelldrucksonde die radiale Verteilung mehrerer Parameter des zellulären Wasserhaushaltes unter Einbezug der Kortexanatomie (Zellvolumina) ermittelt. Ein Vergleich von elongierenden mit nicht-elongierenden Hypokotylzonen (Abb. 11) lieferte dabei weitere Einsichten über die Beteiligung der verschiedenen biophysikalischen Parameter an der Kontrolle des pflanzlichen Expansionswachstums.

### **4.1.1 Die Elongation des *Ricinus*-Hypokotyls scheint auf eine erhöhte zelluläre Wasserpermeabilität zu basieren.**

Verglichen mit Protoplasten aus nicht-elongierendem Hypokotylgewebe wurden in Protoplasten aus der Elongationszone signifikant erhöhte osmotische Wasserleitfähigkeiten gemessen (Faktor:  $\sim 3$ , Kap. 3.2), was durch zwei unabhängige Messreihen mit unterschiedlichen Methoden reproduziert werden konnte (2.3, Ramahaleo et al., 1999). Diese Befunde weisen darauf hin, dass eine erhöhte zelluläre Wasserpermeabilität eine Basis für das Streckungswachstum des *Ricinus*-Hypokotyls darstellt. Die Werte für die ermittelten osmotischen Wasserpermeabilitäten sind vergleichbar mit denen anderer höherer Pflanzen (Übersicht in Maurel, 1997). Dabei liegen die erhöhten osmotischen Wasserleitfähigkeiten von Protoplasten der Elongationszone jedoch weit unterhalb den osmotischen Wasserleitfähigkeiten von Hypokotylprotoplasten anderer Pflanzenspezies, welche ebenso über Schwellungsassays ermittelt wurden (Faktor:  $\sim 10$ , Ramahaleo et al., 1999). Verglichen mit Werten, die mit der Zelldrucksonde für zelluläre hydraulische Leitfähigkeiten im Kortex des Hypokotyls von neun Tage alten *Ricinus*-Keimlingen durchgeführt wurden (Meshcheryakov et al., 1992), sind dagegen die in dieser Arbeit ermittelten osmotischen Wasserleitfähigkeiten erhöht (Faktor  $\sim 3$ ). Dies weist darauf hin, dass im *Ricinus*-Hypokotyl die Wasserleitfähigkeit zellulärer Membranen mit dem Alter des Keimlings abnimmt. Außerdem scheint eine relativ geringe zelluläre Wasserleitfähigkeit spezifisch für das Hypokotyl von *Ricinus communis* zu sein. Daher könnten gerade in diesem viele Zellschichten umfassenden Pflanzenorgan in Reihe geschaltete hydraulische Widerstände ko-limitierend für das Elongationswachstum sein.

Für die osmotischen Wasserleitfähigkeiten von isolierten Vakuolen ergaben sich im Mittel keine Unterschiede zwischen elongierenden und nicht-elongierenden Geweben (Kap. 3.2). Erst bei der Aufteilung nach Zellgrößen zeigte sich eine erhöhte Wasserleitfähigkeit größerer Vakuolen von expandierenden Zellen (Abb. 9), was ebenso die Notwendigkeit hoher osmotischer Wasserleitfähigkeiten während des Streckungswachstums andeutet.

Die erhöhte Wasserleitfähigkeit großer Vakuolen elongierender Zellen scheint durch Quecksilber auf das Level des nicht-elongierenden Stadiums inhibierbar zu sein (Abb. 9). Dies deutet darauf hin, dass die gemessenen Vakuolen größtenteils einer Zellpopulation mit geringem Anteil an aktiven und/oder Quecksilber-insensitiven tonoplastischen Aquaporinen entstammen. Alternativ gibt es Hinweise, dass die im verwendeten Puffer vorhandenen Kalziumionen speziell den Aquaporin-vermittelten Wasserfluss inhibieren (Gerbeau et al., 2002). Unterschiede zwischen den Hypokotylzonen würden in diesem Falle auch für die protoplastischen  $P_f$  unterschätzt worden sein. Im Gegensatz zu Maurel et al. (1997) zeigte sich keine drastisch höhere osmotische Wasserpermeabilität von Tonoplasten gegenüber der osmotischen Wasserpermeabilität von Plasmalemma und Tonoplasten (Protoplasten-‘Hülle’). Dies ist wahrscheinlich durch die deutlich längere Isolationsprozedur von Vakuolen (Kap. 2.3) zu begründen, deren Resultat eine Vakuolenpopulation mit erniedrigter osmotischen Wasserpermeabilität ist. Das Volumen der isolierten Protoplasten war im Mittel mit dem der Vakuolen vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

#### **4.1.2 Der Wasserhaushalt peripherer Kortextzellen scheint das Streckungswachstum des *Ricinus*-Hypokotyls zu determinieren**

In den äußeren Kortextzellen gewährleistet eine spezielle Konstellation von Zellturgor, elastischem Modulus und der zellulären Wasseraustauschkapazität ein starkes Streckungswachstum des *Ricinus*-Hypokotyls.

##### **4.1.2.1 Radiale Verteilung der Zellvolumina**

Die radiale Verteilung der kortikalen Zellgrößen zeigt in allen Hypokotylzonen des *Ricinus*-Keimlings einen parabel-ähnlichen Verlauf, wobei die kleinen, dickwandigen Zellen der Peripherie die röhrenförmige Versteifung des pflanzlichen Spross repräsentieren. Die kleinen Zellvolumina im inneren Kortex charakterisieren den Leitbündelring mit den kambialen Anlagen. Dazwischen füllen großlumige Zellen mit relativ dünnen Zellwänden den größten kortikalen Raum aus. Ähnliche Verhältnisse der zellulären Größenverteilung zeigten sich auch in etiolierten Keimstängeln der Sojabohne (Nonami & Boyer, 1993; Steudle & Boyer, 1985).

##### **4.1.2.2 Radiale Verteilung des zellulären Turgors**

Der Turgor nimmt in der Elongationszone dunkel gehaltener Keimlinge über den gesamten Kortex von außen nach innen hin nahezu linear ab (Abb. 11, A). Dieser graduelle Verlauf tritt im Kortex nicht-elongierender Hypokotylzonen nicht auf. Dieses Phänomen könnte darauf hindeuten, dass die physikalisch treibende Kraft für Zellexpansion (Turgor) gerade in der Kortextperipherie mit vielen, kleinen Zellen und starrem Apoplast (Kap. 4.1.2.3) zur Bewerkstelligung starker Hypokotylelongation besonders erhöht sein muss.

Der Wertebereich des gemessenen Turgors stimmt gut mit den Befunden eines neun Tage alten *Ricinus*-Keimlings überein (Meshcheryakov et al., 1992). Hier steigt jedoch der Turgor zum Kortextinneren hin an und verhält sich somit ähnlich wie der Turgor in der vormaligen ‘Elongationszone’ belichteter Keimlinge dieser Arbeit (Abb. 11). Ob analog zu Meshcheryakov et al. (1992) der Turgor das osmotische Potential der Zellen widerspiegelt,

und damit keine messbaren Wasserpotentialgradienten vorherrschen, konnte aufgrund fehlender Messungen des osmotischen Potentials des Zellsaftes nicht gezeigt werden. Die starke Streuung der Turgorwerte v. a. in nicht elongierenden Hypokotylzonen deutet möglicherweise darauf hin, dass hier keine deutlichen radialen Gradienten des Turgors vorliegen. Sie könnte aber auch ein Hinweis darauf sein, dass ein ausgelöster Turgorabfall, nach Anstechen der Zelle durch die Zelldrucksonde, nicht gleichmäßig durch "Zurückschieben" des Meniskus rückgängig gemacht wurde (Kap. 2.4.3).

#### **4.1.2.3 Radiale Verteilung des elastischen Moduls der Zellwände**

Der elastische Modul zeigt von allen gemessenen Wasserparametern die größten Unterschiede zwischen elongierenden und nicht-elongierenden Gewebeabschnitten (Abb. 11). Besonders in den äußeren Bereichen des Kortex wurde in der Elongationszone ein signifikant geringerer elastischer Modulus gegenüber dem ehemals elongierenden Hypokotyl nach Belichtung als auch gegenüber basalen Zone gemessen (Faktor: bis 2,5).

Der elastische Modul ist im engeren Sinne ein Parameter für die elastische (reversible) Extensibilität der Zellwand (Steudle, 1993a). Da angenommen werden kann, dass plastische und elastische Eigenschaften von Zellwänden in gewisser Näherung korrelieren, lässt dieser Parameter begrenzt Rückschlüsse über die plastische Extensibilität einer Zelle zu. Nach dieser Annahme scheinen elongierende Gewebe des *Ricinus*-Hypokotyls gerade im mittleren und äußeren Bereich des Kortex eine deutlich erhöhte (plastische) Extensibilität aufzuweisen. Im inneren Kortex scheint diese Extensibilität, unabhängig von der Expansionsaktivität, hoch zu sein. Somit deutet sich auch im Hypokotyl des *Ricinus*-Keimlings eine Kontrolle des Elongationswachstums durch die mechanischen Eigenschaften der Sprossperipherie an (vgl. Cosgrove, 1993; Peters & Tomos, 1996).

Die gegenüber dem Turgor um ~10-fach erhöhten Werte des elastischen Moduls repräsentieren die typischen Verhältnisse turgeszenter Zellen (Steudle, 1993a). Die niedrigen Werte des elastischen Moduls in der Elongationszone stimmen mit den Befunden aus Soja-Epi- bzw. -Hypokotyl überein (Cosgrove & Steudle, 1981; Steudle & Boyer, 1985). Im Soja-Hypokotyl wurden, ähnlich zur vorliegenden Arbeit, ein erniedrigter elastischer Modul im elongierenden Bereich des Hypokotyls, verglichen mit ausgereiftem Hypokotylgewebe, nachgewiesen (Steudle & Boyer, 1985). Die Höhe des elastischen Moduls für die Elongationszone belichteter Keimlinge gleicht wiederum den Werten eines neun Tage alten *Ricinus*-Keimlings (Meshcheryakov et al., 1992).

Es fällt auf, dass in allen untersuchten Zonen des Hypokotyls ein zum Kortexinneren gerichteter, starker Gradient des elastischen Moduls auftritt. Die Ausprägung dieses Gradienten ist umso stärker, je höher der mittlere Wert des elastischen Moduls in den jeweiligen Geweben ist. "...hohe elastische Module bedeuten eine geringe Extensibilität..." bzw. "...eine starre Zellwand" (Steudle, 1993a). Damit spiegeln die radialen Gradienten des elastischen Moduls wahrscheinlich die rohrförmige Konstruktion der Hypokotylachse mit mechanisch stabilem äußeren Bereich wieder. Dieser typische Aufbau pflanzlicher Sprossachsen dient in erster Linie der Verbiegungssteifigkeit (im Gegensatz zur Zugfestigkeit der Wurzel), was für das

*Ricinus*-Hypokotyl an verstärkten Zellwänden bzw. an dichtem Gewebe in der Peripherie augenscheinlich wurde. Neben der Abhängigkeit von physiologisch-anatomischen Parametern zeigt der elastische Modul pflanzlicher Zellen nach dem Hooke'schen Gesetz eine direkte Proportionalität mit dem zellulären Volumen (Kap. 2.4.4, Gleichung 2). In den mittleren und inneren Bereichen des Kortex des *Ricinus*-Hypokotyls gehorcht der zelluläre elastische Modul in guter Näherung dieser Gesetzmäßigkeit. In der Peripherie des Kortex deutet sich diese Korrelation für die Elongationszonen belichteter und dunkel gehaltener Keimlinge zwar an (Abb. 11), scheint jedoch von den physiologisch-anatomischen Zellparametern teilweise überlagert zu werden.

#### 4.1.2.4 Radiale Verteilung der Halbwertszeiten zellulärer Druckrelaxationen

In den äußeren Bereichen des Kortex sind die Halbwertszeiten zellulärer Druckrelaxationen in elongierendem Hypokotyl wesentlich geringer als in nicht-elongierenden Geweben (Abb. 11, Faktor: ~8). Hier zeigt sich tendenziell die Proportionalität von Zelloberfläche und Geschwindigkeit des Wasseraustauschs (1. Ficksches Diffusionsgesetz). Daraus lässt sich ableiten, dass die wasserleitende Kapazität pro Membranfläche nur in den peripheren Zellschichten elongierender Gewebe erhöht ist. Hier scheint sie die Voraussetzung für starkes Streckungswachstum zu sein.

Vergleichbar zu den Befunden der vorliegenden Arbeit wurde im Soja-Hypokotyl eine positive Korrelation der Wasseraustauschkapazität mit der Zellgröße nur im Kortex nicht-elongierender Zellen gemessen (Steudle & Boyer, 1985). In elongierendem Gewebe dieser Pflanze steigen die Halbwertszeiten von der Peripherie zur Kortexmitte hin tendenziell ebenso an (Steudle & Boyer, 1985; Nonami et al., 1997). Hier liegen die Halbwertszeiten auch im Bereich mehrerer Sekunden und sind damit deutlich länger als in elongierendem Erbsen-Epikotyl (Cosgrove & Steudle, 1981). Im Kortex von neun Tage alten *Ricinus*-Keimlingen tritt eine indirekte Korrelation der gemessenen Halbwertszeiten mit der Zellgröße auf (Meshcheryakov et al., 1992). Damit gleichen sich die Daten dieser früheren Studie mit den Befunden für die nicht-elongierenden Hypokotylzonen der vorliegenden Arbeit auch im Hinblick auf den Parameter Halbwertszeit.

#### 4.1.3 Im *Ricinus*-Hypokotyl deutet sich eine Limitierung des Streckungswachstums durch die hydraulische Gewebeleitfähigkeit an

Aus den erhobenen Daten des zellulären Wasserhaushalts geht die hydraulische Wasserleitfähigkeit von Hypokotylzellen hervor (Kap. 2.4.4). Wie sich aus den Befunden zur Halbwertszeit zellulärer Druckrelaxationen schon andeutet, wird auch sie in der kortikalen Peripherie des Hypokotyls streng korrelierend mit dem Streckungswachstum modifiziert. Dies zeigt, dass die  $L_p$  ein wichtiger Parameter bei der Regulation von pflanzlichem Volumenwachstum sein könnte. Als Voraussetzung für dieses Regulativ müssten die hydraulischen Leitfähigkeiten von Zellen im Gewebeverband grundsätzlich limitierend für das Streckungswachstum sein können. Besteht diese Voraussetzung, sollte sich über das expandierende Gewebe ein deutlicher radialer Wasserpotentialgradient ausbilden ( $>0,05$  MPa; Fricke,

2002). Weiterhin sollte die volumetrische Extensibilität nicht viel kleiner als der mittlere hydraulische Leitwert des Gewebes sein, da sonst eine überwiegende Limitierung des Volumenwachstums durch Zellwandwiderstände angezeigt würde (Boyer, 1985; Fricke, 2002).

In radialer Richtung wurde über das kortikale Gewebe des *Ricinus*-Hypokotyls eine quantitative Abschätzung der in Reihe geschalteten zellulären Widerstände durchgeführt. Damit wurde ein Wasserpotentialgradient von  $\sim 0,5$  MPa sowie ein Verhältnis von volumetrischer Extensibilität zu mittlerem hydraulischen Leitwert des Gewebes von  $\sim 7$  ermittelt (Kap. 3.3.6). Dies deutet darauf hin, dass während des Elongationsstadiums das Gewebewachstum hauptsächlich durch die hydraulische Leitfähigkeit und geringfügig auch durch Zellwandwiderstände limitiert wird. Im Wesentlichen entspricht dieser Befund den Verhältnissen in elongierendem Soja-Hypokotyl, wobei in diesem Pflanzenmodell die Limitierung des Streckungswachstums in etwa gleichem Maße auf hydraulischen und mechanischen Gewebeeigenschaften basiert (Boyer et al., 1985; Nonami & Boyer, 1993).

Für ein hypothetisches Hypokotylmodell, das mit der ermittelten Wachstumsrate von  $\sim 15,2\%$  elongiert, in dem jedoch die  $L_p$  der nicht-elongierenden Gewebe vorherrschen, wurden Wasserpotentialgradienten von mehr als 1 MPa berechnet (Kap. 3.3.6). Diese Modellsituation wurde deshalb gewählt, da u. U. die Wasserleitfähigkeit von Zellmembranen während der Elongation transient soweit erhöht sein könnte, dass keine Limitierung des Volumenwachstums durch die Gewebeleitfähigkeit auftritt. Die Modellierung mit den Wasserleitfähigkeiten der nicht-elongierenden Gewebe sollte für diesen Fall demonstrieren, dass diese transiente Erhöhung der Wasserleitfähigkeiten notwendig ist, da die geringen Wasserleitfähigkeiten der nicht-elongierenden Gewebe eine starke Limitierung verursachen würden. Der mittlere hydraulische Leitwert wäre dabei ca. 20 mal geringer als die volumetrische Extensibilität. Das Wachstum wäre in diesem Fall hauptsächlich von den hydraulischen Eigenschaften des Gewebes limitiert ( $m \gg L$ ). Derartige Verhältnisse sind in pflanzlichen Geweben kaum vorstellbar und bisher auch nicht ermittelt worden (Übersicht in Fricke, 2002). Folglich findet zur Gewährleistung der vorherrschenden Elongationsrate des *Ricinus*-Hypokotyls offensichtlich eine Reduktion des hydraulischen Widerstandes statt. Im Gegensatz dazu könnte die Verringerung des Volumenwachstums sowohl durch endogene Faktoren entlang des Hypokotyls als auch durch Licht als externes Signal, über eine Erhöhung dieses hydraulischen Widerstandes realisiert werden. Demnach könnte die Regulierung des Expansionswachstums im Hypokotyl von *Ricinus communis* maßgeblich über Veränderungen des biophysikalischen Parameters  $L_p$  bewerkstelligt werden. Die Korrelation der räumlichen Verteilung von hydraulischer Leitfähigkeit und dem regulierbaren Aquaporin *RcPIP1-1* unterstützt diese These (Kap. 4.2.6.2).

Ogleich also im Kortex des *Ricinus*-Hypokotyls einzelne Zellen Wasser in einem Zeitraum von wenigen Sekunden austauschen können (Abb. 11), scheint die Summe der hydraulischen Widerstände über mehrere Zellschichten auch für das vergleichsweise langsam vorstatten gehende Expansionswachstum in den limitierenden Bereich zu kommen. Eine vergleichbare Situation würde besonders in solchen Pflanzenorganen zum Tragen kommen, in denen einerseits geringe zelluläre Wasserleitfähigkeiten vorherrschen; andererseits das Ge-



webe viele Membranbarrieren zwischen den expandierenden Zellen und dem Xylem als Ort der Wasserbereitstellung aufweist. Das Hypokotyl des *Ricinus*-Keimlings stellt ein derartiges Pflanzenorgan dar. Es weist in radialer Richtung allein im Kortex mehr als 15 Zellschichten auf, deren Wasserleitfähigkeiten niedriger als in elongierenden Keimstängeln anderer Pflanzen sind (Cosgrove & Steudle, 1981; Steudle & Boyer, 1985; Ramahaleo et al., 1999; Morillon & Lassalles, 1999). Damit könnte gerade im *Ricinus*-Hypokotyl auch den Aquaporinen als molekulare Komponente eine wichtige, funktionelle Bedeutung bei der Regulation des Volumenwachstums zukommen. Im Gegensatz dazu könnte eine Limitierung des Streckungswachstums durch Zellwandparameter in vergleichsweise zarten Geweben (z. B. *Arabidopsis*-Hypokotyl mit insgesamt nur 2 kortikalen Zellschichten [Gendreau et al., 1997]) bzw. in Geweben mit sehr hohen zellulären Wasserleitfähigkeiten (z. B. Erbsen-Epikotyl mit  $>1000 \mu\text{m/s}$ , Cosgrove & Steudle, 1981) eine übergeordnete Rolle spielen.

Zur Berechnung der kortikalen Wasserpotentialgradienten wurde angenommen, dass Hypokotylwachstum stationär verläuft und dass 'Wachstumswasser' ausschließlich auf transzellulärem Weg durch den Kortex transportiert wird. Da im Kortexgewebe des *Ricinus*-Hypokotyls das Cytosol einen extrem dünnen Saum zwischen Tonoplast und Plasmalemma ausfüllt, wurde ein sehr hoher hydraulischer Widerstand des symplastischen Weges postuliert. Ähnlich hohe hydraulische Widerstände wurden für Wasserflüsse längs des sehr dünnen Apoplasten angenommen. Aufgrund nicht transpirierender Bedingungen (Kap. 2.1) sollte für diese Wasserflüsse auch kein hydrostatisches Druckpotential als treibende Kraft auftreten. Aufgrund dieser Annahmen muss bei der Interpretation des obigen Modells jedoch folgendes beachtet werden: In dem Maße, in dem 'Wachstumswasser' in radialer Richtung neben dem transzellulären Pfad auch andere Transportwege benutzt, wird der berechnete radiale Wasserpotentialgradient und somit eine Limitierung des Expansionswachstum durch hydraulische Parameter gegenüber der *in vivo*-Situation überschätzt. Wenn der radiale Wasserpotentialgradient um mehr als das 10-fache überschätzt würde, läge unter den ermittelten Bedingungen (hohe hydraulische Leitfähigkeit,  $15,2 \%_h$  Wachstum) während der Elongation keine Limitierung durch die hydraulische Leitfähigkeit vor. Im hypothetischen Modell mit der geringen hydraulischen Leitfähigkeit von nicht-elongierendem Gewebe würde sich dennoch eine Ko-Limitierung der Gewebeexpansion durch die hydraulische Leitfähigkeit andeuten (Wasserpotentialgradient  $> 0,05 \text{ MPa}$ ). Daher wäre es selbst im Falle einer derart extremen Fehleinschätzung noch möglich, dass die Wachstumsrate des *Ricinus*-Hypokotyls nur durch Veränderung der hydraulischen Gewebeleitfähigkeit beeinflusst wird.

Der hohe Wert der berechneten volumetrischen Extensibilität ist sowohl von der Wachstumsrate als auch vom effektiven Turgor ( $P_c - Y_o$ ) abhängig (Gleichung 8. Kap. 2.4.4). Damit würde eine Wachstumslimitierung durch hydraulische Parameter dann überschätzt werden, wenn der *yield threshold* wesentlich geringer als der Turgor ist. Der benutzte Wert des *yield threshold* wurde so gewählt, dass sein Verhältnis zum Turgor ähnliche Zustände repräsentiert, wie sie im wachsenden Hypokotyl der Augenbohne (Okamoto et al., 1990) bzw. in Maiswurzeln ohne osmotischem Stress auftreten (Frensch & Hsiao, 1995). Sollte der *yield threshold* von elongierendem Hypokotylgewebe trotzdem viel geringer als der Turgor sein, wäre die

volumetrische Extensibilität *in planta* kleiner als unter der angenommenen Modellsituation. Selbst bei einem unerwartet großen effektiven Turgor würde jedoch das Verhältnis von volumetrischer Extensibilität und hydraulischem Leitwert ( $\sim 1$ ) noch eine Limitierung des Elongationswachstums durch hydraulische Parameter andeuten.

Aufgrund einer geringen Datenmenge für den innersten Tiefenabschnitt des Hypokotylkortex, wurden die Werte für den Wasserpotentialgradient, den mittleren Leitwert und die volumetrische Extensibilität nur aus den Daten der Tiefenabschnitte 0-4 berechnet. Gerade der innerste Tiefenabschnitt repräsentiert jedoch den Leitbündelring, der als elementare Barriere für radialen Wasserfluss agieren könnte (Nonami et al., 1997; Fricke, 2002; Tang & Boyer, 2002). Da innerhalb dieses Tiefenabschnittes in jedem Fall viele Zellübergänge von radial fließendem Wasser überwunden werden müssen (kleine Zellen, Abb. 3), wurde der berechnete Wasserpotentialgradient gegenüber dem tatsächlich auftretenden Wasserpotentialgradient zwischen Xylem und Kortex höchstwahrscheinlich unterschätzt.

Die hydraulischen Leitfähigkeiten aus den Messungen mit der Zelldrucksonde (Abb. 11) wurden in osmotische Wasserpermeabilitäten umgerechnet (Kap. 2.4.4). Diese sind deutlich höher als die osmotischen Wasserpermeabilitäten, welche mittels Schwellungsassays generiert wurden (Abb. 8, Faktor 5-10). Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Erstens könnte die Isolationsprozedur der Schwellungsassays die Wasserpermeabilität der analysierten Protoplasten erniedrigt haben. Beispielsweise könnten in den verwendeten Puffern enthaltene Kalziumionen die Aquaporinaktivität der Membranen inhibieren, was eine derart niedrige Leitfähigkeit erklären würde (Gerbeau et al., 2002). Zweitens ist es möglich, dass die Daten der Schwellungsassays nicht repräsentativ für die kortikale Zellpopulation sind, sondern für Zellen deren Protoplasten im Mittel eine geringere Wasserleitfähigkeit aufweisen. Unter Umständen könnte gerade diese Protoplastenpopulation die Isolationsprozedur besser überstanden und so zu den erniedrigten Permeabilitäten geführt haben. Daher muss für die Erhebung von Daten der zellulären Wasserleitfähigkeit in pflanzlichen Geweben eindeutig die Zelldrucksonde nach Hüsken et al. (1978) als bessere Methode angesehen werden. Sie eröffnet nicht nur die Möglichkeit, die genaue Lage der analysierten Zellen innerhalb des Gewebes festzustellen, sie scheint auch wesentlich geringer die *in vivo* vorherrschende Wasserleitfähigkeit zu beeinträchtigen. Grundsätzlich bleibt bei dieser Methode das Problem bestehen, dass Zellen tiefer liegender Schichten ( $>1$  mm) schwer zugänglich sind. Außerdem kann das zur Berechnung der hydraulischen Leitfähigkeit notwendige Zellvolumen nicht direkt gemessen werden. In erster Linie diese beiden Schwierigkeiten führten zu quantitativ und qualitativ unzureichenden Daten in den innenliegenden Schichten des Hypokotylkortex von *Ricinus* (Tiefenabschnitt 5, Abb. 11). Durch die gleichmäßige radiale Verteilung der Zellvolumina und deren aufwendiger Analyse (Abb. 8), konnten diese Fehlerquellen für die mittleren und äußeren Bereiche des Kortex minimiert werden.

Für alle ermittelten Parameter des zellulären Wasserhaushalts gleichen die Verhältnisse der nicht-elongierenden Hypokotylzonen den Befunden die Meshcheryakov et al. (1992) in der Elongationszone eines 9-Tage alten *Ricinus*-Keimlings erhob. Diese Korrelation deutet zusammen mit verschiedenen Mängeln des Versuchsaufbaus dieser zurückliegenden Arbeit

darauf hin, dass die damals untersuchten Keimlinge nicht dem vollständig etiolierten Status entsprachen. Schon während der Anzucht wiesen die Keimlinge im Durchschnitt geringere Elongationsraten auf. Dies könnte einerseits in der unterschiedlichen Anzuchtart (Vermikulit), andererseits im höheren Alter der Keimlinge begründet sein. Die Messungen wurden bei Raumlicht über einen Zeitraum von teilweise mehreren Stunden durchgeführt (Komor, persönliche Mitteilung), was wahrscheinlich zu einer weiteren Verringerung der Elongationsrate führte. Darüber hinaus wurden die Keimlinge während den Messungen horizontal positioniert, wobei wahrscheinlich eine gravitropische Aufkrümmungsreaktion initialisiert wurde. Dieser Tropismus basiert auf einer Induktion von Volumenwachstum auf der Unterseite und einer Inhibition von Volumenwachstum auf der Oberseite der Elongationszone. Da Meshcheryakov et al. (1992) die Messungen mit der Zelldrucksonde gerade an der Oberseite der Elongationszone vornahmen, kann davon ausgegangen werden, dass die erhobenen Daten nicht- oder wenig-elongierendes Kortextgewebe repräsentieren. Durch folgende Maßnahmen sollte in dieser Arbeit eine möglichst unverminderte Elongationsaktivität während der Messungen mit der Zelldrucksonde sichergestellt werden: Zum einen wurde der Keimling in senkrechter Position über einen Zeitraum von maximal einer Stunde analysiert. Zum anderen wurden dunkel gehaltene Keimlinge bis zum Beginn der Experimente keinerlei Belichtung ausgesetzt. Außerdem fanden die Messungen mit der Zelldrucksonde unter physiologisch inaktivem Grünlicht bei gleichzeitiger Bestrahlung mit dunkelrotem Licht statt. Dies gewährleistete einen Verbleib des Phytochromsystems im inaktiven Zustand und unterband somit jedwede photomorphogenetische Reaktionen. Daher konnte qualitativ bei allen dunkel gehaltenen Keimlingen eine starke Elongation am Ende des jeweiligen Experiments festgestellt werden.

## 4.2 Das Aquaporin *RcPIP2-1* ist eine molekulare Komponente bei der Regulation des pflanzlichen Streckungswachstums

Aus dem Hypokotyl von *Ricinus communis* wurden drei intrinsische Membranproteine isoliert und als Vertreter der Genfamilie der *MIP* identifiziert. Innerhalb dieser Familie repräsentieren sie die phylogenetischen Gruppen der *PIP1* (*RcPIP1-1*), der *PIP2* (*RcPIP2-1*) und der *TIP1* (*RcTIP1-1*) (Johanson et al., 2001).

### 4.2.1 *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP3-1* sind intrinsische Membranproteine

Gorin et al. (1984) isolierte aus Rind als erster das *MIP BtMIP26* und postulierte dafür den charakteristischen Aufbau der *MIP* als intrinsische Membranproteine: 6 transmembrane Helices mit 5 verbindenden Schleifen, cytosolischen N- und C-Termini sowie einem amphipathischen Abschnitt zur Bildung der wasserspezifischen Pore. Diese grundlegende Struktur gilt inzwischen für *MIP* aller Organismenreiche als gesichert, und wurde u. a. durch kristallographische Methoden in neuerer Zeit bestätigt (Heymann et al., 1998; Mitsuoka et al., 1999; De Groot et al., 2000). Basierend auf eine Hydropathieanalyse nach Kyte & Doolittle

(1982) zeigen auch *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* ein für Aquaporine typisches Hydrophathieprofil, das die oben erwähnte strukturelle Organisation andeutet. Dies ist ein Indiz dafür, dass die beobachteten MIP in Membranen von *Ricinus communis* intrinsische Aquaporine ausbilden.

#### **4.2.2 RcPIP1-1, RcPIP2-1 und RcTIP1-1 sind möglicherweise sensitiv für Quecksilberionen**

Cystein-Reste scheinen die notwendige strukturelle Basis für die Schwermetall-Sensitivität von Aquaporinen darzustellen (Daniels et al., 1996; Krajinski et al., 2000). RcPIP1-1 und RcPIP2-1 erfüllen mit mehreren, z. T. stark konservierten, Cystein-Resten diese Voraussetzung (Abb. 13). Eine Sensitivität des RcPIP1-1 bzw. RcPIP2-1 vermittelten Wasserflusses auf Schwermetallionen ist dadurch wahrscheinlich. Innerhalb der PIP, welche Cystein-Reste an homologen Positionen aufweisen, sind sowohl Schwermetall-sensitive als auch -insensitive Vertreter identifiziert worden (Kammerloher et al., 1994; Daniels et al., 1994; Biela et al., 1999). Daher kann auch eine Insensitivität der beiden untersuchten PIP gegenüber Schwermetallen nicht völlig ausgeschlossen werden.

Innerhalb der TIP scheint Schwermetall-Sensitivität auf das Vorkommen eines einzigen, konservierten Cystein-Restes am Ende der dritten membrandurchspannenden Helix zu basieren (Daniels et al., 1996). Schwermetall-sensitive Vertreter dieser Unterfamilie weisen sowohl eine sehr hohe strukturelle Ähnlichkeit als auch diesen Cystein-Rest mit RcTIP1-1 gemeinsam auf (Abb. 13). Daher wird für RcTIP1-1 Schwermetall-Sensitivität postuliert. In diesem Zusammenhang könnte die Quecksilber-Sensitivität erhöhter osmotischer Wasserleitfähigkeit großer Vakuolen aus elongierendem Gewebe (Abb. 9) auf eine Rolle des RcTIP1-1 während des Streckungswachstums hindeuten.

#### **4.2.3 RcPIP1-1, RcPIP2-1 und RcTIP1-1 sind als orthodoxe MIP wahrscheinlich spezifisch für Wasser als Substrat**

Neben der großen Gruppe der klassischen Aquaporine, welche von den meisten PIP und TIP gebildet wird, wurden in einer Vielzahl von Organismen Glyzeroporine sowie Aquaglyzeroporine mit bifunktionaler Transportaktivität identifiziert. Während die erstgenannte Gruppe nahezu ausschließlich Wasser als Substrat transportiert, sind Glyzeroporine spezifisch für Glyzerin; Aquaglyzeroporine transportieren Wasser und Glyzerin in vergleichbarem Maße. Darüber hinaus gibt es Vertreter fast aller Unterfamilien, die weniger spezifische Kanäle für verschiedene Substrate wie Glyzerin, Harnstoff, Kohlendioxid, Ammoniak, Borsäure usw. bilden (Überblicke in: Santoni et al., 2000; Maurel & Chrispeels, 2001; Tyerman et al., 2002). Froger et al. (1998) identifizierten in MIP fünf distinkte Positionen, an denen bestimmte Aminosäurereste die verschiedenen Porine unterscheidend typisieren. Nach Lagrée et al. (1998, 1999) scheinen die Aminosäurereste dieser Positionen den Oligomerisierungsstatus und die Substratspezifität der MIP zu diskriminieren.

Alle drei untersuchten MIP haben, wie viele pflanzliche orthodoxe Aquaporine, an den entscheidenden Positionen typische Reste des Aquaporin-consensus (Kap. 0., Abb. 13). Dies

deutet stark darauf hin, dass es sich bei RcPIP1-1, RcPIP2-1 und RcTIP1-1 auch funktionell um orthochoxe Aquaporine handelt, die vornehmlich Wasser transportieren und wahrscheinlich *in planta* als Homotetramere vorliegen. Ob beispielsweise analog zu NtAQP1 oder Nt $\alpha$ TIP auch andere kleinere, ungeladene Stoffe transportiert werden (Biela et al., 1999; Gerbeau et al., 1999), und ob dies von physiologischer Relevanz für die Elongation des *Ricinus*-Hypokotyls ist, bleibt zunächst unklar. Aufgrund der Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten MIP zu anderen orthochoxen Aquaporinen ist dies jedoch eher unwahrscheinlich (siehe Kap. 3.4.3).

#### 4.2.4 RcPIP2-1 weist eine typische Phosphorylierungsdomäne auf

Pflanzen verfügen mit der Proteinphosphorylierung über einen posttranslationalen Mechanismus zur Regulation der Aquaporinaktivität (Überblicke in: Johansson et al., 2000; Maurel et al., 1997). Als Phosphorylierungsstellen wurden für Aquaporine mehrere Serinreste identifiziert, die außerhalb der transmembranen Helizes auf cytoplasmatischer Seite lokalisiert sind (Weaver & Roberts, 1992; Maurel et al., 1995; Johansson et al., 1998; Guenther et al., 2003). RcPIP1-1 und RcPIP2-1 weisen mehrere dieser, z. T. innerhalb der PIP sehr konservierten, Phosphorylierungsmotive auf (Kap. 3.4.2.4). Somit besteht die Möglichkeit, dass die Aquaporinaktivität von RcPIP1-1 und RcPIP2-1 durch reversible Phosphorylierung posttranslational reguliert wird. Besonders das C-terminale Phosphorylierungsmotiv von RcPIP2-1 (Ser<sup>273</sup>) könnte eine wichtige Rolle bei der posttranslationalen Regulation von Aquaporinaktivität spielen. Es ist identisch mit der orthologen Domäne von SoPM28A, welche nicht nur obligat für die hohe Aquaporinaktivität dieses PIP2 ist, sondern sowohl *in vitro* als auch *in vivo* tatsächlich phosphoryliert wird (Johansson et al., 1998; Johansson et al., 1996). Der Phosphorylierungsstatus und damit auch die Aquaporinaktivität des SoPM28A verhält sich *in planta* indirekt proportional zum vorherrschenden Wasserdefizit. Dies deutet darauf hin, dass auch RcPIP2-1 eine wesentliche Rolle bei der Regulierung der Plasmalemma-Wasserleitfähigkeit zufallen könnte. Die Zugehörigkeit von SoPM28A und RcPIP2-1 zu einer relativ kleinen Gruppe eng verwandter PIP2, die dieses C-terminale Phosphorylierungsmotiv aufweisen, unterstützt diese These.

Die AS-Sequenz des RcTIP1-1 lässt keine Rückschlüsse auf eine posttranslationale Regulierung durch Phosphorylierung zu. Der Serinrest in Schleife D (Abb. 13) könnte nach Roberts & Harmon (1992) zwar als Phosphorylierungsmotiv fungieren, Hinweise auf eine Regulierung der Aquaporinaktivität an dieser Position gibt es aus anderen Arbeiten nicht. So besitzt RcTIP1-1 diesen Serinrest gemeinsam mit dem eng verwandten TIP1 AtTIP1-1, dessen Aquaporinaktivität scheint *in vitro* jedoch nicht sensitiv für die regulierende Eigenschaft von Proteinkinasen zu sein (Maurel et al., 1997). Darüber hinaus weist RcTIP1-1, im Gegensatz zu seinen Homologen Pv $\alpha$ TIP (Maurel et al., 1995) und Nt $\alpha$ TIP (Johnson & Chrispeels, 1992), keinen phosphorylierbaren Serinrest in der N-terminalen Extension auf (Abb. 13). Daher wird zunächst nicht davon ausgegangen, dass RcTIP1-1 *in planta* einer posttranslationalen Regulierung durch (De-)Phosphorylierung unterliegt.

#### 4.2.5 RcPIP2-1 und RcTIP1-1 sind funktionelle Wasserkanäle

Zum experimentellen Nachweis der Wassertransportkapazität sollten die drei MIP funktionell charakterisiert werden. Als Testsystem für die Funktionalität von Aquaporinen etablierte Preston et al. (1992) Schwellungstests mit *Xenopus*-Oozyten, die nach Injektion von MIP-spezifischer RNA funktionelle Aquaporine exprimierten. Obwohl diese Tests inzwischen routinemäßig zur Charakterisierung von Aquaporinen eingesetzt werden, weist das System einige Nachteile auf. Neben einem relativ hohen experimentellen Aufwand (Mikromanipulation und -injektion, Verfügbarkeit der *Xenopus*-Oozyten) führt die Injektion von MIP-RNA nicht zwingend zu einer Ausprägung des funktionellen Aquaporins (Lagree et al., 1998). Ein weiteres System zum Nachweis von Aquaporinaktivität von MIP ist die *stopped-flow* Spektrometrie an isolierten Hefevesikeln, die funktionelle Aquaporine heterolog exprimieren (Laize et al., 1995). Aus der Geschwindigkeitskonstante der generierten Schrumpfungskinetiken können die osmotischen Wasserleitfähigkeiten der Vesikelmembranen berechnet, und somit Rückschlüsse auf mögliche Aquaporinaktivität gezogen werden.

Aufgrund der Verfügbarkeit einer *stopped-flow* Apparatur am Laboratorium für Biochemie der Universität Bayreuth konnte auf diese Art des experimentellen Nachweises von Aquaporinvermitteltem Wassertransport zurückgegriffen werden. Zur heterologen Expression der observierten MIP wurde analog zu Laize et al. (1995) der Stamm NY17 von *Saccharomyces cerevisiae* gewählt. Hefen dieses Stammes sind im sekretorischen Apparat defizient (*sec6-4*-Mutante) und akkumulieren *post*-Golgi Vesikel homogener Größe in hoher Konzentration. Diese Vesikel können relativ einfach isoliert werden (Walworth & Novick, 1987) und exprimieren außerdem keine funktionalen Aquaporine (Laize et al., 1995), was die hohe Aktivierungsenergie und Quecksilber-Insensitivität ihrer Wasserleitfähigkeit begründet (Laize et al., 1995).

Eine erfolgreiche Transformation von NY17 mit den rekombinanten MIP *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* konnte durch Detektion der spezifischen Transkripte in gRNA der jeweiligen Hefeklone zweifelsfrei nachgewiesen werden, was für *RcPIP1-1* auch nach der Analyse mehrerer Hefeklone nicht möglich war (Kap. 3.5.1.1). Die Ursache dafür konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr aufgeklärt werden. Nach der Isolation der *post*-Golgi Vesikel zeigte der spezifische Nachweis von RcPIP2-1 und RcTIP1-1 in vesikulärem Membranprotein die erfolgte Translation und das fehlerfreie *targeting* der heterolog exprimierten MIP an (Kap. 3.5.1). Erwartungsgemäß war für *RcPIP1-1* kein spezifisches Protein in den Vesikelmembranen detektierbar.

Um für die Membranen der verschiedenen MIP-Transformanten die osmotische Wasserpermeabilität berechnen zu können, wurde das Volumen der isolierten Vesikel bestimmt. Dazu wurden stellvertretend von Vesikelsuspensionen der *RcPIP2-1*- und der Kontrolltransformante elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt und die abgebildeten Vesikel vermessen. Aufgrund der elektronenmikroskopischen Analysen gibt es Hinweise, dass sich eine Suspension isolierter Vesikel aus einer dominanten Population kleiner Vesikel und einer weiteren Population größerer Vesikel zusammensetzt (Kap. 3.5.2).

Der hydrodynamische Vesikeldurchmesser, der mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelt wurde, liegt etwas höher als der hydrodynamische Vesikeldurchmesser, der aus der elektronenmikroskopischen Analyse berechnet wurde (Kap. 3.5.2). Dies könnte auch darauf hindeuten, dass in den Suspensionen isolierter Vesikel tatsächlich zwei Populationen unterschiedlicher Größe vorkommen (Abb. 16; Abb. 17). Dabei sind die größeren Vesikel zahlenmäßig zwar unterrepräsentiert (Abb. 17, A), führen aber zu einer leichten Überschätzung des mittleren Vesikelvolumens durch die Messung der dynamischen Lichtstreuung (Chu, 1991). Die mittels *stopped-flow* Spektroskopie generierten Schrumpfungskinetiken gehorchen doppelt exponentiellen Funktionen (Abb. 18). Dies könnte zwar auf ein Vorhandensein zweier Vesikelpopulationen mit unterschiedlichen Kapazitäten der Wasserleitfähigkeit hinweisen, macht jedoch die Existenz zweier Größenpopulationen wahrscheinlich. Ob die größeren Vesikel eine Unterpopulation der akkumulierten post-Golgi Vesikel repräsentieren oder ob sie anderen Membransystemen entstammen (Plasmalemma, Mikrosomen, Vakuolen usw.), ist unklar. In früheren Veröffentlichungen wurde eine Größenverteilung der isolierten Hefevesikel nicht analysiert (Walworth & Novick, 1987; Laize et al., 1995). Außerdem trat eine zusammengesetzte Kinetik anscheinend nicht auf (Laize et al., 1995). Der Durchmesser der kleinen Kontrollvesikel dieser Arbeit entspricht genau dem Wert, der in jenen früheren Arbeiten für isolierte Hefevesikel ermittelt wurde (Walworth & Novick, 1987; Laize et al., 1995). Vergleichbar damit haben die entsprechenden Vesikel des *RcPIP2-1*-transformierten Hefeklons einen um ca. 20% erhöhten Durchmesser. Dies könnte darauf hindeuten, dass ein geringfügig niedrigeres osmotisches Potential des Vesikelsuspensionsmediums eine leichte Schwellung der isolierten Vesikel verursacht hat. Der Größenunterschied zwischen kleinen Vesikeln aus *MIP*-Transformante und Kontrollhefe trat bei der Messung der dynamischen Lichtstreuung nicht auf. Hier bewirkte möglicherweise ein zur Messung der dynamischen Lichtstreuung notwendiger Verdünnungsschritt eine Angleichung der Vesikelgröße (Kap. 2.7).

Vesikuläre Membranen aus der *RcPIP2-1*-Transformante zeigen gegenüber Membranen des Kontrollhefeklons eine signifikant erhöhte osmotische Wasserleitfähigkeit und eine für Aquaporin-vermittelten Wasserfluss charakteristisch niedrige Aktivierungsenergie (Tab. XII). Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass das rekombinante *RcPIP2-1* aus *Ricinus communis* in Hefezellen osmotisch getriebenen Wassertransport über Membranen erleichtert, und somit für ein funktionelles Aquaporin codiert.

Für *RcTIP1-1*-transgene Hefe konnte gegenüber der Kontrolle eine erhöhte osmotische Wasserpermeabilität nur für große Vesikel nachgewiesen werden. Für kleine Vesikel deutet die geringe Aktivierungsenergie Aquaporin-vermittelten Wasserfluss an. Daher ist wahrscheinlich auch das *RcTIP1-1* aus *Ricinus communis* ein funktionelles Aquaporin. Die Aktivierungsenergie für Wassertransport über Membranen der großen Vesikel der *RcTIP1-1*-Transformanten ist scheinbar höher als die der Vektorkontrolle (Tab. XII). Dies beruht wahrscheinlich auf die geringe Datenmenge (v. a. für tiefere Temperaturen) die zur Berechnung der linearen Regression herangezogen werden konnte (Abb. 19, B).

Es fällt auf, dass kleine Vesikel eine deutlich höhere  $P_f$  aufweisen als große Vesikel, die Expression eines Aquaporins aber für beide Populationen eine vergleichbare Veränderung der

$P_f$  gegenüber der Kontrolle nach sich zieht. Dies deutet an, dass Membranen kleiner Vesikel sowohl eine höhere Basis-Permeabilität für Wasser aufweisen als auch eine erhöhte Ausstattung an heterologen Aquaporinen besitzen. Darüber hinaus könnte die Zuordnung der Teilreaktionen der Schrumpfungskinetiken zu den unterschiedlichen Vesikelgrößen fehlerhaft sein. Sichere Hinweise dafür gibt es jedoch nicht.

#### **4.2.6 Die Lokalisation von Aquaporinen im *Ricinus*-Hypokotyl deutet deren unterschiedliche physiologische Funktionen an**

Die Befunde der durchgeführten Expressionsanalysen deuten darauf hin, dass Aquaporinen eine maßgebliche Rolle während des Streckungswachstums des *Ricinus*-Hypokotyls zukommen könnte. Darüber hinaus scheint Aquaporin-vermittelter Wassertransport auch bei anderen physiologischen Vorgängen wichtig zu sein.

##### **4.2.6.1 *RcPIP1-1* scheint konstitutiv exprimiert zu sein**

Auf mRNA-Ebene zeigt *RcPIP1-1* von allen drei analysierten Aquaporinen die geringsten Unterschiede in der Expression zwischen verschiedenen stark elongierenden Hypokotylabschnitten (Abb. 20, Abb. 21). Auf Proteinebene fallen diese Unterschiede der *RcPIP1-1*-Expression zwischen den verschiedenen Hypokotylzonen noch geringer aus. Sein relativer Anteil in der Plasmamembran scheint unabhängig von der Expansionsaktivität des Gewebes konstant zu bleiben. Da eine starke Elongation mit einer Vergrößerung der absoluten Membranfläche einhergeht, steht das in Einklang mit der leichten, transienten Erhöhung der mRNA in elongierendem Gewebe (Abb. 21). Ein leichter, Licht-unabhängiger Anstieg des *RcPIP1-1* -zusammen mit der Zellgröße und damit mit dem Volumen-/Oberflächen-Verhältnis der Zellen- könnte eine Rolle im zellulären Wasserhaushalt andeuten. Die physikalisch begründete Gegebenheit, dass großen Zellen zum Austausch eines relativen Anteils ihres Volumens an Wasser weniger Membranfläche zur Verfügung steht als kleinen Zellen, könnte durch Erhöhung der Wasserleitfähigkeit ihrer Membranen kompensiert werden. Ob dieser Wasseraustausch *in planta* stattfindet, und inwieweit eine derartige Kompensation physiologisch relevant ist, ist unbekannt.

Auf zellulärer Ebene zeigt *RcPIP1-1* unabhängig von Elongationsaktivität eine konstitutive Expression. Dies deutet zusammen mit dem Fehlen von *RcPIP1-1* in Xylemgewebe eine Funktion an, die nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit wachstumsabhängigen Wasserflüssen steht. Vergleichbar damit zeigen auch eng verwandte *PIP1* anderer Pflanzenspezies gerade in wachsenden Teilen sehr geringe Expression (Jones & Mullet, 1995; Baiges et al., 2001) bzw. sind vornehmlich in Wurzel und Blüten exprimiert (Jones & Mullet, 1995; Yamada et al., 1997; Biela et al., 1999; Baiges et al., 2001). In *Arabidopsis* scheinen *PIP1* tendenziell konstitutiv exprimiert zu sein (Ward, 2003). Aufgrund dieser Befunde wird davon ausgegangen, dass *RcPIP1-1* keine maßgebliche Rolle bei der Regulation des Volumenwachstums zukommt. Die Korrelation der *RcPIP1-1*-Lokalisation mit dem Auftreten von Stärke (Kap. 3.8) deutet möglicherweise eine Vermittlung der Wasserflüsse an, die mit einer verstärkten Auf-



nahme aktiver Osmotika bzw. deren Freisetzung aus osmotisch inaktiven Polysachariden einhergehen (Balane, 1997).

Für alle Immunodetektionen des RcPIP1-1 wurde spezifisches Rohserum verwendet. Da in den *westernblots* neben der spezifischen Proteinbande sowie in Kontrollexperimenten mit Präimmunserum keinerlei Färbesignal auftaucht (Abb. 15 & Abb. 25), kann von einer hohen Spezifität der angewandten Immunodetektionen ausgegangen werden.

#### 4.2.6.2 *RcPIP2-1* zeigt ein charakteristisches Expressionsmuster in wachsendem Gewebe

Von den analysierten Aquaporinen weist die Expression von *RcPIP2-1* die strengste Korrelation mit unterschiedlicher Elongationsaktivität des *Ricinus*-Hypokotyls auf (Abb. 20, Abb. 22, Abb. 29 & Abb. 30). Speziell die Expressionsanalysen auf zellulärer Ebene machen deutlich, dass in den peripheren Gewebeschichten von elongierendem Gewebe die Ausprägung von *RcPIP2-1* mit einer besonders hohen zellulären Wasserleitfähigkeit korreliert (Abb. 11, Abb. 29). Zusätzlich könnte das transiente Vorkommen von *RcPIP2-1* in den kleinen Zellen des Xylem- und Phloemparenchyms von elongierendem Gewebe (Abb. 30) eine Regulation des Streckungswachstums über lokale Veränderungen der Wasserleitfähigkeit andeuten. Dies würde in Einklang stehen mit Tang & Boyer (2002), die gerade die vielen Zellschichten des Xylems als entscheidende Barriere von radial fließendem Wachstumswasser ansehen. Aufgrund dieser Befunde könnte *RcPIP2-1* eine wichtige molekulare Komponente bei der Regulation des Streckungswachstums von *Ricinus*-Keimlingen darstellen. Auf eine vergleichbare Funktion deutet auch die Expression sequenziell sehr ähnlicher *PIP2* anderer Spezies. So wird *ScPIP2a* aus *Solanum chacoense* während des Volumenwachstums von Frucht- und Griffelgewebe induziert (O' Brien et al., 2002). *VhPIP2-2* aus *Vitis hybrida* (*berlandieri/rupestris*) ist v. a. in Stängeln, Wurzelspitzen und wachsenden Blättern induziert, wohingegen es in ausgewachsenen Blättern nur gering ausgeprägt ist (Baiges et al., 2001). Zur Beendigung des Elongationswachstums wird im Gegensatz zur mRNA (Abb. 22, Abb. 29) sowie zum faszikulär vorhandenen Protein (Abb. 30) das *RcPIP2-1* auf gewebe-spezifischer Ebene nicht reprimiert (Abb. 26). Diese scheinbar konträren Befunde lassen sich wie folgt deuten. Unter elongierenden Bedingungen fällt die Menge des im Leitbündelrings vorhandenen *RcPIP2-1* in der Mikrosomenfraktion des gesamten Gewebes nicht ins Gewicht. Diese repräsentiert in erster Linie die Zellen des Parenchyms. Dort könnte eine hohe Expressions- und Translationsaktivität auch nach Rückgang der spezifischen Transkriptmenge zur Akkumulation des *RcPIP2-1* führen. Zur Reduktion der mutmaßlich *RcPIP2-1*-bedingten Wasserleitfähigkeit auf das niedrigere Niveau des reifen Hypokotyls, sollte daher ein weiterer Regulationsmechanismus existieren. Denkbar wäre eine posttranslationale Veränderung der wasserleitenden Aktivität von *RcPIP2-1* über eine Veränderung dessen Phosphorylierungsstatus. Als strukturelle Voraussetzung dafür besitzt *RcPIP2-1* in der C-terminalen Extension ein potentiell Phosphorylierungsmotiv (Kap. 4.2.4). Analog zu *SoPM28A* aus *Spinacea oleracea* (Johansson et al., 1996; Johansson et al., 1998) könnte auch die Aquaporinaktivität des *RcPIP2-1* über diese Phosphorylierungsstelle reguliert werden. Denkbar

wäre auch eine Steuerung der subzellulären Lokalisation des RcPIP2-1 durch reversible Phosphorylierung analog zu HsAQP2. Dieses menschliche Aquaporin wird in Abhängigkeit seines Phosphorylierungsstatus durch einen Exo- und Endozytosemechanismus zwischen Plasmamembran und dem endoplasmatischen Membrankompartiment ausgetauscht (Van Balkom et al., 2002). Unter diesen Umständen würde im *Ricinus*-Hypokotyl die Regulation des Streckungswachstums über unterschiedliche Mechanismen bewerkstelligt werden: Im Kortextgewebe würde innerhalb des endogenen Entwicklungsprogramms eine inaktivierende Dephosphorylierung, unter Belichtung eine Reprimierung des *RcPIP2-1* zu einer reduzierten Wasserleitfähigkeit der Zellmembranen führen. In der faszikulären Barriere für radial fließendes Wachstumswasser würde dagegen nur der letztgenannte Mechanismus zum Tragen kommen.

Bei der *in situ*-Hybridisierung wurde die Spezifität der mRNA-Detektion durch fehlendes Färbesignal bei Hybridisierungen mit *sense*-Sonden angezeigt (Abb. 29). Für die Immunolokalisierungen konnte die Spezifität des Färbesignals im Leitbündelring durch Behandlung mit Peptid-gesättigtem Antikörper sichergestellt werden (Abb. 30). Dabei verhinderte die unspezifische Färbung weitere Befunde zur zellulären Lokalisation von RcPIP2-1 im Parenchym.

#### **4.2.6.3 *RcTIP1-1* könnte funktionell am zellulären Osmosehaushalt beteiligt sein**

Die Expressionsanalysen des *RcTIP1-1* auf Proteinebene deuten eine konstitutive, elongationsunabhängige Ausprägung im *Ricinus*-Hypokotyl an (Abb. 27, Abb. 31). Dabei zeigen die Befunde der Immunolokalisierungen prägnante Übereinstimmungen mit den nahe verwandten *TIP1*, *BoTIP26-1* und *BoTIP26-2*. Ebenso wie das *RcTIP1-1* sind diese beiden Orthologe v.a. in den lebenden Zellen des Xylems und im Apikalmeristem exprimiert (Barrieu et al., 1998; Barrieu et al., 1999). Außerdem werden sie im Tonoplast unter Wasserdefizit inseriert und daher mit einer Adaption der Pflanze an Trocken- oder Salzstress in Verbindung gebracht (Barrieu et al., 1999). Diese Funktion wird auch für das *AtTIP1-2* aus *Arabidopsis thaliana* diskutiert (Pih et al., 1999).

Unter Berücksichtigung dieser Befunde deutet sich an, dass *RcTIP1-1* bei der Regulation der Hypokotylelongation eine untergeordnete Rolle spielt. Ob ihm eine mögliche Rolle bei der Adaptation von Wasserdefiziten zufällt, kann zunächst nicht sicher geschlossen werden. Vergleichbar mit *RcPIP1-1* könnte *RcTIP1-1* auch während der Verlagerung bzw. Freisetzung von osmotisch aktiven Substanzen physiologisch relevant sein. Möglicherweise agiert bei diesen Vorgängen die Vakuole als Wasserreservoir um Veränderungen des osmotischen Potentials im volumenmäßig sehr viel kleinerem Cytosol abzuf puffern. Lokal auftretende Gradienten des Wasserpotentials könnten hier durch effektiven Austausch von Wasser über die Tonoplastenmembran kompensiert werden. Inwieweit ein derartiges Regulativ aufgrund endogener Vorgänge notwendig ist, ist nicht bekannt. Für eine Anpassung der Pflanze an veränderliche Bedingungen der äußeren Umgebung, wurde dieser 'Puffer osmotischer Fluktuationen' schon diskutiert (Maurel, 1997; Barrieu et al., 1999).

Die verringerte Expression des *RcTIP1-1* auf der Außenseite des Hypokotylhakens dunkel gehaltener Keimlinge (Abb. 31), ist ein weiteres Indiz für eine Funktion dieses MIP vornehm-

lich in nicht elongierenden Zellen. Die verstärkte Expression im Leitbündelring der Zellteilungszone dunkel gehaltener Keimlinge weist in die gleiche Richtung (Abb. 31).

Im Gegensatz zu den Expressionsanalysen auf Proteinebene suggeriert zunächst der Nachweis spezifischer mRNA, dass auch *RcTIP1-1* eine Rolle beim Expansionswachstum von Hypokotylgewebe zukommt. Dies wird durch Befunde untermauert, welche eine funktionelle Beteiligung weiterer homologer TIP1 am Volumenwachstum pflanzlicher Zellen andeuten. So zeigt auch *RsTIP1-1* aus *Raphanus sativa* im Hypokotyl eine lichtinduzierte Reduktion auf mRNA-Level (Higuchi et al., 1998). Das Homolog *BnγTIP2* aus *Brassica napus* wird als molekulare Komponente des Primärwurzelwachstums diskutiert (Gao et al., 1999). Vom gut charakterisierten *AtTIP1-1* aus *Arabidopsis thaliana* wurde gezeigt, dass es auf mRNA-Ebene korrelierend mit der Elongation der Internodien exprimiert wird (Phillips & Huttly, 1994; Hanzawa et al., 1997). Den *TIP1* eine Rolle während des pflanzlichen Volumenwachstums zuzuordnen, basierte in diesen Arbeiten in erster Linie auf Expressionsanalysen mittels mRNA-Detektion (Phillips & Huttly, 1994; Hanzawa et al., 1997; Gao et al., 1999; Higuchi et al., 1998). Da die Expressionsanalyse des *RcTIP1-1* auf Protein-Ebene jedoch deutlich andere Befunde liefert (Abb. 27), wurde vermutlich auch in den vorangehenden Arbeiten die physiologische Relevanz der *TIP1* für das Zellstreckungswachstum überschätzt. Hier könnte das vermehrte Auftreten von spezifischen Transkripten während der Elongation eine *de novo*-Synthese von Aquaporinen für sich ausdehnende Membranflächen repräsentieren (siehe auch *RcPIP1-1*).

Sollte *RcTIP1-1* die elementare funktionelle Komponente für die tonoplastische Wasserleitfähigkeit von Hypokotylzellen sein, so korreliert dessen Expression auf Protein-Ebene mit den Befunden der Vakuolenschwellungstests. Hier zeigten sich ebenso keine maßgeblichen Unterschiede zwischen elongierenden und nicht-elongierenden Hypokotylabschnitten (Abb. 8, B), was ein weiteres Indiz gegen die maßgebliche Beteiligung von *RcTIP1-1* am Elongationswachstum des *Ricinus*-Hypokotyls sein könnte.

Da für *RcTIP1-1* die Expressionsanalysen auf Protein-Ebene mit affinitätsgereinigten Antikörpern durchgeführt wurden (Kap. 2.10), und die Kontrollen der Immunolokalisierungen keinerlei Färbesignal aufwiesen, kann diesbezüglich von sicheren Befunden gesprochen werden.

Kreuzreaktionen aller verwendeten Antikörper können bei der Immunodetektion der MIP nicht völlig ausgeschlossen werden, sind jedoch relativ unwahrscheinlich. Erstens repräsentieren die verwendeten Antikörper nicht-konservierte Epitope der jeweiligen MIP. Zweitens gehören die drei analysierten MIP verschiedenen monophyletischen Gruppen an und sind in ihrer jeweiligen Gruppe wahrscheinlich die mit der stärksten Expression (Kap. 3.4).

Generell veranschaulichen die Befunde dieser Arbeit, dass Expressionsanalysen nur begrenzt Aussagen über das tatsächliche Auftreten einer Proteinfunktion zulassen. Expressionsanalysen sollten daher möglichst sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene durchgeführt werden. Damit werden fehlerhafte Interpretationen zur Funktion eines Gens unwahrscheinlicher.

### 4.3 *RcSCR1* könnte die Assimilatverteilung in *sink*-Organen determinieren

Der *RcSCR1* ist ein *high affinity*-Saccharosesymporter aus der *SUT1*-Unterfamilie (Kuhn, 2003; Williams et al., 2000). Vertreter dieser Unterfamilie zeigen eine spezifische Expression in den Geleitzellen (Stadler et al., 1995; Stadler & Sauer, 1996) und beladen das Phloem mit energiereichen Assimilaten (Sauer & Stolz, 1994). Dies deutet zusammen mit den Lokalisationsbefunden dieser Arbeit (Abb. 34) auf eine Funktion des *RcSCR1* bei der Beladung des Phloems hin. Interessanterweise scheint sich die Expression des *RcSCR1* dabei indirekt proportional zur Stärke des *sink* zu verhalten. Dass in der Zellteilungs- und Elongationszone des *Ricinus*-Hypokotyls eine massive Entladung des Phloems mit Assimilaten stattfindet (Balane, 1997), ergänzt sich gut mit der Abwesenheit eines aktiven Beladungscarriers dort. Wenn nach Beendigung des Streckungswachstums (endogen oder lichtinduziert) die *sink*-Stärke der Elongationszone abnimmt, könnte eine Induktion des *RcSCR1* möglicherweise einen Verlust von Assimilaten (Saccharose) aus dem Phloem kompensieren. Dieser auf aktiven Zuckertransportern basierende *retrival*-Mechanismus wurde bisher postuliert (Kuhn, 2003; Williams et al., 2000), konnte bisher aber noch nicht direkt gezeigt werden.

Aufgrund dieser Befunde wird davon ausgegangen, dass die physiologische Funktion des *RcSCR1* nicht in direktem Zusammenhang mit dem Elongationswachstum des *Ricinus*-Hypokotyls steht. Unter Umständen spielt der *RcSCR1* dabei jedoch eine indirekte Rolle, insofern seine vollständige Repression im elongierenden Hypokotyl die effektive Entladung des Phloems gewährleisten könnte. Möglicherweise reduziert die Induktion von *RcSCR1* die Netto-Entladung des Phloems, was die Verfügbarkeit von Osmotika und damit die Zellexpansion einschränken würde. Dies könnte einen weiteren Mechanismus bei der Regulation pflanzlichen Streckungswachstums darstellen.

Unklar ist die Rolle des *RcSCR1* in den großen Idioplasten der Epidermis. Hier wäre lediglich eine Bereitstellung von Saccharose als Energielieferant für den sekundären Pflanzenstoffwechsel denkbar (z. B. Anthocyansynthese).

Auf mRNA-Ebene scheint sich die Expression des *RcSCR1* nicht indirekt proportional zur Stärke des *sink* zu verhalten. Dieser Unterschied zu den Befunden der Immunolokalisierung ist schwer zu deuten. Möglicherweise fällt die erhöhte mRNA-Menge einzelner Zellen bei der Analyse auf gewebespezifischer Ebene gegenüber einer *RcSCR1*-Hintergrundexpression' kaum ins Gewicht. Letztere könnte bei der Immunolokalisierung, gegenüber der lokal sehr starken Expression in den Einzelzellen, übersehen worden sein.

Da für die anderen Zuckercarrier RcHEX1, RcHEX3, RcHEX6 und RcSCR2 keine gewebespezifischen Lokalisierungen durchgeführt wurden, können nur begrenzt Rückschlüsse über deren physiologische Funktionen gezogen werden. Eine unmittelbare Funktion bei der Regulation der Elongation kann aufgrund der begrenzten Korrelation mit der Expansionsaktivität der Hypokotylabschnitte (Abb. 33) derzeit nicht abgeleitet werden.

## 4.4 Der Stärkekatabolismus könnte eine treibende Kraft für das Streckungswachstum sein

Die Stärkeverteilung entlang des *Ricinus*-Hypokotyls (Kap. 3.6.2) und deren Korrelation mit dem Expressionsmuster des *RcPIP1-1* bzw. *TIP1-1* (Kap. 3.8) könnte andeuten, dass diese *MIP* Wasserflüsse vermitteln, welche an die Verlagerung von osmotisch wirksamen Assimilaten aus dem Stärkekatabolismus gekoppelt sind (Kap. 4.2.6.1 & 4.2.6.3). Die indirekte Proportionalität von Stärkemenge und Zellgröße deutet darauf hin, dass die Stärke der Hypokotylzellen ein Reservoir für energiereiche Assimilate ist. Während der Zellvergrößerung wird dieses Reservoir durch Freisetzung von osmotisch aktiven Assimilaten verbraucht. Die so generierten zellulären Wasserpotentialgradienten würden durch den Einstrom von Wasser und der einhergehenden Zellexpansion kompensiert. In diesem Modell wäre der Stärkekatabolismus eine treibende Kraft für das Streckungswachstum des Hypokotyls, die involvierten Enzyme mögliche regulierende Komponenten.

## 4.5 Die Regulation des pflanzlichen Streckungswachstums ist komplex

Aus den Befunden der vorliegenden Arbeit, lässt sich ein hypothetisches Modell der komplexen Regulation des Streckungswachstums von Pflanzenorganen wie dem *Ricinus*-Hypokotyl aufstellen:

Grundsätzlich findet Expansionswachstum von Zellen mit einer plastisch verformbaren Zellwand nur statt, wenn der Turgor als primär treibende Kraft höher als der kritische Turgor ist (Lockhart, 1965). Diese Voraussetzung spiegelt sich in Gleichung 8 (Kap. 2.4.4) wieder und wird nach Cosgrove (1993) **zur Initiation des Expansionswachstums** durch eine Zellwanderweichung und der damit einhergehenden Erniedrigung des kritischen Turgors erzeugt. Das dadurch hervorgerufene Ungleichgewicht zwischen dem Betrag des hydrostatischen Druckpotentials (Turgor) und des osmotischen Potentials der Zelle, generiert einen einwärts gerichteten Gradienten des Wasserpotentials, was eine Aufnahme von Wasser und eine Zunahme des zellulären Volumens zur Folge hat (Cosgrove, 1993). Als elementare molekulare Komponenten dieser Zellwanderweichung agieren Expansine und andere zellwanderweichende Enzyme (Cosgrove, 2001).

**Während des Streckungswachstums** ko-limitieren die Bereitstellung von Osmotika sowie hydraulische und apoplastische Eigenschaften des Gewebes in vergleichbarem Maße und bilden zusammen die Basis für hohe Elongationsraten. Zur Aufrechterhaltung des einwärts gerichteten Wasserpotentialgradienten (und somit der treibenden Kraft für die Zellexpansion) erfolgt eine aktive Aufnahme osmotisch wirksamer Substanzen (Zucker u. a.) bzw. deren Freisetzung durch den Katabolismus transient gespeicherter Stärke (Balane, 1997). Als molekulare Komponenten werden dazu verstärkt Parenchym-beladende Zuckercarrier und Enzyme des Stärkekatabolismus exprimiert. Phloem-beladende Carrier (z. B. *RcSCR1*) werden vollständig reprimiert, da deren Expression die Osmotika-Verfügbarkeit für kortikale Zellen

reduzieren würde. Gleichbedeutend ist dabei eine plastisch leicht verformbare Zellwand als Grundlage für die hohe Extensibilität des Gewebes. Die involvierten molekularen Komponenten sind wiederum die bereits erwähnten Expansine und andere Zellwand-erweichende Enzyme (Cosgrove, 2001). Eine ebenso wichtige Rolle spielt die hohe hydraulische Leitfähigkeit des Gewebes. Sie bildet die Basis dafür, dass während des starken Streckungswachstums keine hohen, radialen Wasserpotentialgradienten generiert und weniger Osmotika akkumuliert werden müssen (Fricke, 2002); bzw., dass bei geringen, radialen Wasserpotentialgradienten trotzdem hohe Wachstumsraten vollzogen werden können. Dazu werden, als molekulare Grundlage für die entsprechend hohe hydraulische Gewebsleitfähigkeit, verstärkt funktionelle Aquaporine exprimiert (z. B. *RcPIP2-1*). Gleichzeitig bildet sich dabei für die Pflanze die Kapazität heraus, die hydraulische Gewebsleitfähigkeit effektiv posttranslational regulieren zu können.

Dies kommt **bei der Veränderung der Elongationsrate** zum Tragen. Durch das Vorhandensein regulierbarer Wasserkanäle könnte die hydraulische Leitfähigkeit und somit die Elongationsrate schnell und effektiv reguliert werden. So könnte nach Belichtung oder innerhalb eines endogenen Entwicklungsprogramms, die Verringerung des Streckungswachstums durch Inhibition von Aquaporinen bewirkt werden (z. B. Dephosphorylierung des *RcPIP2-1*). Die dazu notwendigen Voraussetzungen sind jedoch nur in Geweben mit vielen, radial angeordneten Zellschichten und/oder geringer Kapazität für zellulären Wasseraustausch gegeben. In zarten Geweben, wie beispielsweise dem *Arabidopsis*-Hypokotyl (Gendreau et al., 1997), sind diese Voraussetzungen schwer vorstellbar. Wiederum sind die Disposition der Zellwände und die entsprechenden molekularen Komponenten involviert (siehe oben). Eine Reduktion der Elongationsraten wird demnach zusätzlich durch Verringerung der plastischen Extensibilität beschleunigt. Gleiches gilt für die Verfügbarkeit osmotisch aktiver Substanzen. Zur Verringerung des Streckungswachstum über eine Reduktion verfügbarer Osmotika, kann die Expression phloembeladender *Carrier* (z. B. *RcSCR1*) zusätzlich beitragen (Kap. 4.3).

**Bei der vollständigen Inhibition des Streckungswachstums** kommt die hydraulische Gewebsleitfähigkeit nicht maßgeblich zum Tragen. Nach Lockhart (1965) lässt sich das stationäre Wachstum einer Zelle einerseits durch das Produkt aus mittlerem hydraulischen Leitwert und auftretendem Wasserpotentialgradient (Gleichung 6, Kap. 2.4.4), andererseits durch das Produkt aus volumetrischer Extensibilität und effektivem Turgor ( $P_c - Y_c$ ) (Gleichung 8, Kap. 2.4.4) beschreiben. Aus dem ersten Zusammenhang wird ersichtlich, dass durch hydraulische Parameter eine vollständige Limitierung des Streckungswachstums nur dann bewerkstelligt werden kann, wenn der mittlere hydraulische Leitwert und damit die hydraulische Leitfähigkeit gleich Null, also die zellulären Membranen vollkommen undurchlässig für Wasser sind. Da biologische Membranen ohne jedwede Aquaporinaktivität und sogar eine reine Phospholipid-Doppelschicht noch erhebliche hydraulische Leitfähigkeiten aufweisen (Finkelstein, 1987) wird deutlich, dass andere biophysikalische Parameter an der Erzeugung nicht-elongierenden Bedingungen beteiligt sein müssen. Aus dem zweiten Zusammenhang (Gleichung 8, Kap. 2.4.4) geht hervor, dass über die mechanischen Zellwandeigenschaften sehr wohl ein Volumenzuwachs von Null und damit nicht-elongierende Bedingungen erzeugt

werden können. Diese Situation ist dann gegeben, wenn durch Erhärtung der Zellwand der Wert des kritischen Turgors auf den Wert des Turgors steigt, bzw. die volumetrische Extensibilität sehr klein wird. Da unter diesen nicht-elongierenden Bedingungen keinerlei Nettofluss von Wasser mehr stattfindet, ist der Wert der vorherrschenden hydraulischen Leitfähigkeit im Hinblick auf das Streckungswachstum physiologisch unerheblich. Wie Nonami & Boyer (1993) für nicht-elongierendes Soja-Hypokotyl zeigten, sind daher in dieser Situation auch für das *Ricinus*-Hypokotyl keine radialen Wasserpotentialgradienten zu erwarten. Hier könnten jedoch stark reduzierte hydraulische Leitfähigkeiten noch das Stadium repräsentieren, in dem eine Verringerung des Streckungswachstums durch eine Reduktion der hydraulischen Gewebeleitfähigkeit verursacht wurde (siehe oben). Wesentlich für nicht-elongierende Bedingungen ist, dass durch eine starke Verringerung der volumetrischen Extensibilität (möglicherweise angedeutet durch hohe Werte des elastischen Moduls) der effektive Turgor als treibende Kraft für die Zellexpansion gegen Null tendiert. In Einklang mit Cosgrove (1993), liegt damit die Initiation und letztendlich auch die vollkommene Inhibition des Streckungswachstums nur in der Veränderung der mechanischen Zellwandeigenschaften. In den dazwischen liegenden Übergangsstadien sowie dem Stadium maximaler Gewebeexpansion spielt der biophysikalische Parameter der hydraulischen Leitfähigkeit und dessen molekulare Komponenten, die Aquaporine, eine maßgebliche Rolle.

## 4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde das komplexe Zusammenspiel mehrerer molekularer und biophysikalischer Komponenten bei der Regulation des Streckungswachstums von *Ricinus*-Keimlingen beleuchtet. Dies geschah in erster Linie durch Aufzeigen von Korrelationen zwischen der zeitlichen und/oder räumlichen Ausprägung der verschiedenen Komponenten. Zum entgeltigen Nachweis, welche spezifische physiologische Funktion den untersuchten Aquaporin- und Zuckertransporter-Genen bei der Regulation des Streckungswachstums *in planta* zukommt, sollten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden. Ein Schwerpunkt sollte dabei auf der Etablierung von *reverse genetics* liegen. Da *Ricinus communis* als rekalcitrante Pflanze gilt (eine einmalig erfolgreiche Regeneration [Molina & Schobert, 1995] konnte bisher nicht reproduziert werden), sollte dabei ein besonderes Augenmerk auf die *RNAi*-Technik gelegt werden. Diese Methode könnte speziell am *Ricinus*-Keimling relativ einfach anwendbar sein (Sebastian Fettig, persönliche Mitteilung), wodurch ein Modellorganismus zur Verfügung stünde, der gleichermaßen hervorragende Eigenschaften für physiologische als auch genetische Analysen aufweist. Dies wäre eine ausgezeichnete Voraussetzung zum umfassenden Studium der biophysikalischen als auch molekularen Grundlagen von pflanzlichem Wachstum und anderer Vorgänge. Im Speziellen sollten die dominanten *MIP*-Gene suprimiert, und die Auswirkungen dieser Suppression auf das Wachstumsverhalten sowie auf die Parameter des zellulären Wasserhaushalts des *Ricinus*-Keimlings untersucht werden. Weiterhin sollte überprüft werden, inwieweit *RcPIP2-1* zu Elongation des Hypokotyls tatsächlich transient phosphoryliert wird, und inwieweit der Phosphorylierungsstatus seine Aquaporinfunktion bzw. seine subzelluläre Lokalisation beeinflusst. Für wachsendes Gewebe

wurde in der vorliegenden Arbeit unter bestimmten Annahmen ein beträchtlicher radialer Wasserpotentialgradient für wachsendes Gewebe errechnet. Dieser Befund sollte weiterführend durch direkte Messung des hydrostatischen sowie osmotischen Potentials in radialer Richtung reproduziert, und die Richtigkeit der getätigten Annahmen bestätigt werden.



---

## 5 Zusammenfassung

Seit den wegweisenden Arbeiten von Peter Agre war bekannt, dass Gene aus der Familie der *major intrinsic proteins* für funktionelle Aquaporine codieren. Auch in Pflanzen stellen diese Wasserkanäle die molekulare Grundlage für hohe Wasserleitfähigkeiten von Membranen dar. Weiterhin zeigte sich eine Korrelation von hoher zellulärer Wasserleitfähigkeit und einer starken Expression verschiedener *MIP* in jungen, wachsenden Geweben. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag daher auf der Frage, welche physiologische Rolle Aquaporine bei der Regulation des Streckungswachstums pflanzlicher Gewebe spielen.

Als Modellorgan diente dabei das Hypokotyl des Keimlings von *Ricinus communis*. Es vollführt im Dunkeln ein starkes Elongationswachstum, welches einerseits unter dem Einfluss eines endogenen Entwicklungsprogramms steht, andererseits als Teilaspekt der Photomorphogenese durch Licht inhibiert wird. Von insgesamt zehn bekannten *Ricinus-MIP* wurden *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* kloniert, da sie gerade im Hypokotyl dominant exprimiert sind. *RcPIP2-1* und *RcTIP1-1* konnten erfolgreich heterolog in Hefe exprimiert, und durch *stopped-flow* Spektroskopie auch als Aquaporine charakterisiert werden.

Die Expression von *RcPIP2-1* zeigt eine deutliche Korrelation mit der Elongationsaktivität des Gewebes entlang der Hypokotylachse sowie mit der Inhibition des Streckungswachstums durch Belichtung. Strukturelle Eigenschaften des *RcPIP2-1* deuten auf eine posttranslationale Regulation hin, welche speziell bei der Beendigung der Elongation innerhalb des endogenen Entwicklungsprogramms von Bedeutung zu sein scheint. Innerhalb der Elongationszone ist *RcPIP2-1* stark in den kleinen Zellen des Xylemparenchyms exprimiert, wo es möglicherweise eine hohe Barriere für radial fließendes 'Wachstumswasser' reduziert. Darüber hinaus zeigt sich während der Elongation eine transient erhöhte Expression von *RcPIP2-1* in der Kortexperipherie. Gerade in Zellen dieses Gewebes ergaben Messungen mit der Zelldrucksonde stark erhöhte Wasserleitfähigkeiten, verglichen mit Zellen aus nicht-elongierenden Hypokotylzonen. Durch eine Modellierung radialer Gradienten des Wasserpotentials konnte gezeigt werden, dass die hydraulische Leitfähigkeit von Zellen im Gewebeverband das Streckungswachstum des *Ricinus*-Hypokotyls grundsätzlich limitieren kann.

Auch die Expression des *RcSCR1* korreliert mit der Elongation und damit der Stärke des *sink* entlang des Hypokotyls. Dieser potentiell Phloem-beladende Saccharosetransporter ist in den Geweben nicht exprimiert, die aufgrund starker Wachstums- und Teilungsaktivität auf die Versorgung mit energiereichen Assimilaten angewiesen sind. Erst wenn mit Beendigung des Streckungswachstums die *sink*-Stärke reduziert wird, tritt eine Induktion des *RcSCR1* auf.

Aus diesen Befunden wird evident, dass die Regulation des Streckungswachstums von *Ricinus*-Keimlingen über eine Veränderung der zellulären Wasserleitfähigkeit erfolgen kann und, dass *RcPIP2-1* eine molekulare Komponente dieses Regulationsmechanismus ist. Darüber hinaus scheint *RcSCR1* in den Ablauf des Streckungswachstums involviert zu sein, indem er die Verfügbarkeit osmotisch aktiver Substanzen bzw. energiereicher Assimilate kontrolliert.



---

## 6 Summary

Since the trailblazing work of Peter Agre, the genes from the family of major intrinsic proteins where known to encode functional aquaporins. In plants, aquaporins are also believed to build the molecular basis for high water conductivities of membranes. Furthermore, correlations of a high cellular water conductivity and a strong expression of different *MIP* showed up in young, growing tissues. Therefore the emphasis of this work was to find out which physiological role aquaporins may play during regulation of elongation growth of plant tissues.

Thereby the hypocotyl of seedlings from *Ricinus communis* L. served as a model organ. In darkness this organ exhibits strong elongation growth, which is controlled by an endogenous developmental program. Upon illumination elongation growth is inhibited as an aspect of photomorphogenesis. Out of ten known *Ricinus*-*MIP*, *RcPIP1-1*, *RcPIP2-1* and *RcTIP1-1* were investigated in detail, because of showing dominant expression straight in the hypocotyl. *RcPIP2-1* and *RcTIP1-1* were successfully expressed in yeast and characterised as aquaporins by stopped-flow spectroscopy.

The expression of *RcPIP2-1* was strongly correlated with elongation activity along the hypocotyl axis and the inhibition of elongation by light exposure. Structural characteristics pointed to posttranslational regulation of *RcPIP2-1*, which seems to be especially important at the end of elongation process within the endogenous developmental program. Inside the elongation zone *RcPIP2-1* is strongly expressed in small cells of the xylem parenchyma, where it possibly reduces a hydraulic barrier for growth-dependent radial water flow. Beyond that *RcPIP2-1* shows a transiently increased expression in the cortex periphery of the elongation-zone. Right in cells of this tissue, pressure probe measurements showed strongly increased hydraulic conductivities compared to cells from non-elongating hypocotyl zones. By modelling radial gradients of water potential it was predicted, that hydraulic conductivities of cells within a complex tissue can limit extension growth of the *Ricinus* hypocotyl.

Beneath that, the expression of the *RcSCR1* correlates inversely with elongation and thus with sink strength along the hypocotyl axis. *RcSCR1*, a putative phloem loading sugar carrier, is absent from those tissues, which are dependent on supply of energy rich assimilates due to strong extension growth and cell division activity. *RcSCR1* is induced, when sink strength is reduced as the consequence of completion of elongation growth.

These findings demonstrate, that regulation of elongation growth in *Ricinus* seedlings can be done by a change of cellular water conductivity. *RcPIP2-1* is possibly a molecular compound of this regulatory mechanism. Beyond that *RcSCR1* seems to be involved into the expiration of elongation growth, by controlling the availability of solutes and/or energy rich assimilates.



---

## Literaturverzeichnis

- Arabidopsis Genome Initiative (2000)** Analysis of the genome of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408, 796-815
- Baiges, I., Schaffner, A. R. & Mas, A. (2001)** Eight cDNA encoding putative aquaporins in *Vitis hybrid* Richter-110 and their differential expression. J Exp Bot 52, 1949-1951
- Balane, S. G. (1997)** Regulation des Stärke- und Zuckermetabolismus in der Wachstumszone des Hypokotyls des Rizinuskeimlings. Dissertation Universität Bayreuth
- Barrieu, F., Marty-Mazars, D., Thomas, D., Chaumont, F., Charbonnier, M. & Marty, F. (1999)** Desiccation and osmotic stress increase the abundance of mRNA of the tonoplast aquaporin *Bob-TIP26-1* in cauliflower cells. Planta 209, 77-86
- Barrieu, F., Thomas, D., Marty-Mazars, D., Charbonnier, M. & Marty, F. (1998)** Tonoplast intrinsic proteins from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*): immunological analysis, cDNA cloning and evidence for expression in meristematic tissues. Planta 204, 335-344
- Beck, E. & Ziegler, P. (1989)** Biosynthesis and degradation of starch in higher-plants. Annu Rev Plant Phys Plant Mol Biol 40, 95-117
- Benton, W. D. & Davis, R. W. (1977)** Screening gammagt recombinant clones by hybridization to single plaques insitu. Science 196, 180-182
- Bick, J. A., Neelam, A., Smith, E., Nelson, S. J., Hall, J. L. & Williams, L. E. ( 1998)** Expression analysis of a sucrose carrier in the germinating seedling of *Ricinus communis*. Plant Mol Biol 38, 425-435
- Biela, A., Grote, K., Otto, B., Hoth, S., Hedrich, R. & Kaldenhoff, R. (1999)** The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. Plant J 18, 565-570
- Boller, T. & Kende, H. (1979)** Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant-cells. Plant Physiol 63, 1123-1132
- Boyer, J. S. (1985)** Water transport. Annu Rev Plant Phys Plant Mol Biol 36, 473-516
- Boyer, J. S., Cavalieri, A. J. & Schulze, E. D. (1985)** Control of the rate of cell enlargement - excision, wall relaxation, and growth-induced water potentials. Planta 163, 527-543
- Bradford, M. M. (1976 )** Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-254

- Caderas, D., Muster, M., Vogler, H., Mandel, T., Rose, J. K. C., McQueen-Mason, S. & Kuhlemeier, C. (2000)** Limited correlation between expansin gene expression and elongation growth rate. *Plant Physiol* 123, 1399-1413
- Cairney, J., Newton, R. J., Funkhouser, E. A. & Chang, S. J. (1995)** Nucleotide-sequence of a cDNA from *Atriplex-canescens* (pursh) nutt - a homolog of a jasmonate-induced protein from barley. *Plant Physiol* 108, 1289-1290
- Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R. & Chrispeels, M. J. (2000)** Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol* 122, 1025-1034
- Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M. J. & Jung, R. (2001)** Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol* 125, 1206-1215
- Chu, B. (1991)** Laser light scattering, basic principles and practice. Ed 2, Academic Press, Boston
- Cosgrove, D. J. (1981)** Analysis of the dynamic and steady-state responses of growth-rate and turgor pressure to changes in cell parameters. *Plant Physiol* 68, 1439-1446
- Cosgrove, D. J. (1986)** Biophysical control of plant-cell growth. *Annu Rev Plant Phys Plant Mol Biol* 37, 377-405
- Cosgrove, D. J. (1993)** Water-uptake by growing cells - an assessment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake, and hydraulic conductance. *International Journal of Plant Sciences* 154, 10-21
- Cosgrove, D. J. (1997)** Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* 9, 1031-1041
- Cosgrove, D. J. (1998)** Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiol* 118, 333-339
- Cosgrove, D. J. (2001)** Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiol* 125, 131-134
- Cosgrove, D. J. & Steudle, E. (1981)** Water relations of growing pea epicotyl segments. *Planta* 153, 343-350
- Dainty, J. (1963)** Water relations in plant cells. *Adv. Bot. Res.* 1, 279-326
- Damm, B. & Willmitzer, L. (1988)** Regeneration of fertile plants from protoplasts of different *Arabidopsis thaliana* genotypes. *Molecular & General Genetics* 213, 15-20
- Daniels, M. J., Chaumont, F., Mirkov, T. E. & Chrispeels, M. J. (1996)** Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. *Plant Cell* 8, 587-599
- Daniels, M. J., Mirkov, T. E. & Chrispeels, M. J. (1994)** The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. *Plant Physiol* 106, 1325-1333

- De Groot, B. L., Heymann, J. B., Engel, A., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y. & Grubmüller, H. (2000)** The fold of human aquaporin 1. *J Mol Biol* 300, 987-994
- Deblock, M. & Debrouwer, D. (1993)** RNA-RNA *in-situ* hybridization using digoxigenin-labeled probes - the use of high-molecular-weight polyvinyl-alcohol in the alkaline-phosphatase indoxyl-nitroblue tetrazolium reaction. *Anal Biochem* 215, 86-89
- Delrot, S., Atanassova, R. & Maurousset, L. (2000)** Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1465, 281-306
- Denker, B. M., Smith, B. L., Kuhajda, F. P. & Agre, P. (1988)** Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane-protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem* 263, 15634-15642
- Dordas, C., Chrispeels, M. J. & Brown, P. H. (2000)** Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiol* 124, 1349-1362
- Finkelstein, A. (1987)** Water movement through lipid bilayers, pores, and plasma membranes. Theory and reality. In: Distinguished lecture Series of the Society of General Physiologists, Vol 4, New York, Wiley, 228-229
- Fleurat-Lessard, P., Frangne, N., Maeshima, M., Ratajczak, R., Bonnemain, J. L. & Martinoia, E. (1997)** Increased expression of vacuolar aquaporin and H<sup>+</sup>-ATPase related to motor cell function in *Mimosa pudica* L. *Plant Physiol* 114, 827-834
- Frensch, J. (1997)** Primary responses of root and leaf elongation to water deficits in the atmosphere and soil solution. *J Exp Bot* 48, 985-999
- Frensch, J. & Hsiao, T. C. (1995)** Rapid response of the yield threshold and turgor regulation during adjustment of root-growth to water-stress in *Zea mays*. *Plant Physiol* 108, 303-312
- Freudig, D. & Sauermost, R. (1999)** Lexikon der Biologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Fricke, W. (2002)** Biophysical limitation of cell elongation in cereal leaves. *Ann Bot* 90, 157-167
- Fricke, W. & Peters, W. S. (2002)** The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiol* 129, 374-388
- Froger, A., Tallur, B., Thomas, D. & Delamarche, C. (1998)** Prediction of functional residues in water channels and related proteins. *Protein Sci* 7, 1458-1468
- Gao, Y. P., Young, L., Bonham-Smith, P. & Gusta, L. V. (1999)** Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of *Brassica napus* during germination under stress conditions. *Plant Mol Biol* 40, 635-644
- Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M. & Höfte, H. (1997)** Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 114, 295-305

- Gerbeau, P., Amodeo, G., Henzler, T., Santoni, V., Ripoche, P. & Maurel, C. (2002)** The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J* 30, 71-81
- Gerbeau, P., Guclu, J., Ripoche, P. & Maurel, C. (1999)** Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J* 18, 577-587
- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A. & Schiestl, R. H. (1992)** Improved method for high-efficiency transformation of intact yeast-cells. *Nucleic Acids Res* 20, 1425
- Gorin, M. B., Yancey, S. B., Cline, J., Revel, J. P. & Horwitz, J. (1984)** The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane - characterization and structure based on cDNA cloning. *Cell* 39, 49-59
- Graber, J. H., Cantor, C. R., Mohr, S. C. & Smith, T. F. (1999)** In silico detection of control signals: mRNA 3'-end-processing sequences in diverse species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14055-14060
- Guenther, J. F., Chanmanivone, N., Galetovic, M. P., Wallace, I. S., Cobb, J. A. & Roberts, D. M. (2003)** Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals. *Plant Cell* 15, 981-991
- Guerrero, F. D. & Crossland, L. (1993)** Tissue-specific expression of a plant turgor-responsive gene with amino-acid-sequence homology to transport-facilitating proteins. *Plant Mol Biol* 21, 929-935
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia-coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580
- Hanzawa, Y., Takahashi, T. & Komeda, Y. (1997)** Acl5: an *Arabidopsis* gene required for internodal elongation after flowering. *Plant J* 12, 863-874
- Heymann, J. B., Agre, P. & Engel, A. (1998)** Progress on the structure and function of aquaporin 1. *J Struct Biol* 121, 191-206
- Heymann, J. B. & Engel, A. (1999)** Aquaporins: phylogeny, structure, and physiology of water channels. *News Physiol Sci* 14, 187-193
- Higuchi, T., Suga, S., Tsuchiya, T., Hisada, H., Morishima, S., Okada, Y. & Maeshima, M. (1998)** Molecular cloning, water channel activity and tissue specific expression of two isoforms of radish vacuolar aquaporin. *Plant Cell Physiol* 39, 905-913
- Hoffman, C. S. & Winston, F. (1987)** A 10-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia-coli*. *Gene* 57, 267-272
- Hoffmann, H. (2004)** Elektronenmikroskopie. Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Universität Bayreuth. <http://btc1x6.che.uni-bayreuth.de/ausstattung/tem.html>
- Hüsken, D., Steudle, E. & Zimmermann, U. (1978)** Pressure probe technique for measuring water relations of cells in higher-plants. *Plant Physiol* 61, 158-163



- Jackson, D. (1991)** *In situ* hybridisation in plants. In Gurr, S. J., McPherson, and Bowles, D. J., eds, Molecular Plant Pathology, A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, 163-174
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Frayssé, L., Weig, A. R. & Kjellbom, P. (2001)** The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol* 126, 1358-1369
- Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C. & Kjellbom, P. (2000)** The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1465, 324-342
- Johansson, I., Karlsson, M., Shukla, V. K., Chrispeels, M. J., Larsson, C. & Kjellbom, P. (1998)** Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* 10, 451-459
- Johansson, I., Larsson, C., Ek, B. & Kjellbom, P. (1996)** The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to  $\text{Ca}^{2+}$  and apoplastic water potential. *Plant Cell* 8, 1181-1191
- Johnson, K. D. & Chrispeels, M. J. (1992)** Tonoplast-bound protein kinase phosphorylates tonoplast intrinsic protein. *Plant-Physiol* 100, 1787-1795
- Jones, J. T. & Mullet, J. E. (1995)** Developmental expression of a turgor-responsive gene that encodes an intrinsic membrane-protein. *Plant Mol Biol* 28, 983-996
- Jung, J. S., Preston, G. M., Smith, B. L., Guggino, W. B. & Agre, P. (1994)** Molecular domains of the water-pathway through aquaporin chip - the hourglass water channel model. *Biophys J* 66, A226
- Kaldenhoff, R., Kolling, A., Meyers, J., Karmann, U., Ruppel, G. & Richter, G. (1995)** The blue light-responsive *Athh2* gene of *Arabidopsis-thaliana* is primarily expressed in expanding as well as in differentiating cells and encodes a putative channel protein of the plasmalemma. *Plant J* 7, 87-95
- Kallarackal, J., Orlich, G., Schobert, C. & Komor, E. (1989)** Sucrose transport into the phloem of *Ricinus communis* L. seedlings as measured by the analysis of sieve-tube sap. *Planta* 177, 327-335
- Kammerloher, W., Fischer, U., Piechottka, G. P. & Schaffner, A. R. (1994)** Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J* 6, 187-199
- Klebl, F., Wolf, M. & Sauer, N. (2003)** A defect in the yeast plasma membrane urea transporter Dur3p is complemented by *CpNIP1*, a Nod26-like protein from zucchini (*Cucurbita pepo* L.), and by *Arabidopsis thaliana*  $\delta$ -TIP or  $\gamma$ -TIP. *FEBS Lett* 547, 69-74
- Komor, E. & Thom, M. (1989)** Isolation of plant vacuoles and measurement of transport. *Methods Enzymol* 174, 552-564

- Krajinski, F., Biela, A., Schubert, D., Gianinazzi-Pearson, V., Kaldenhoff, R. & Franken, P. (2000)** Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of *Mtaqp1* encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta* 211, 85-90
- Kriedemann, P. & Beevers, H. (1967)** Sugar uptake and translocation in castor bean seedling .I. characteristics of transfer in intact and excised seedlings. *Plant Physiol* 42, 161-173
- Kuhn, C. (2003)** A comparison of the sucrose transporter systems of different plant species. *Plant Biol* 5, 215-232
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982)** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-132
- Köckenberger, W. (1994)** Wasser- und Nährstofftransport im Keimling von *Ricinus communis* L. Dissertation Universität Bayreuth
- Lagrée, V., Froger, A., Deschamps, S., Hubert, J. F., Delamarche, C., Bonnet, G., Thomas, D., Gouranton, J. & Pellerin, I. (1999)** Switch from an aquaporin to a glycerol channel by two amino acids substitution. *J Biol Chem* 274, 6817-6819
- Lagrée, V., Pellerin, I., Hubert, J. F., Tacnet, F., Le Caherec, F., Roudier, N., Thomas, D., Gouranton, J. & Deschamps, S. (1998)** A yeast recombinant aquaporin mutant that is not expressed or mis-targeted in *Xenopus* oocyte can be functionally analyzed in reconstituted proteoliposomes. *J Biol Chem* 273, 12422-12426
- Lagrée, V., Froger, A., Deschamps, S., Pellerin, I., Delamarche, C., Bonnet, G., Gouranton, J., Thomas, D. & Hubert, J. F. (1998)** Oligomerization state of water channels and glycerol facilitators: involvement of loop E. *J Biol Chem* 273, 33949-33953
- Laize, V., Rousselet, G., Verbavatz, J. M., Berthoud, V., Gobin, R., Roudier, N., Abrami, L., Ripoché, P. & Tacnet, F. (1995)** Functional expression of the human CHIP28 water channel in a yeast secretory mutant. *FEBS Lett* 373, 269-274
- Lamprecht, J. (1999)** Biologische Forschung Von der Planung bis zur Publikation. Filander-Verlag, Fürth
- Lemoine, R., Burkle, L., Barker, L., Sakr, S., Kuhn, C., Regnacq, M., Gaillard, C., Delrot, S. & Frommer, W. B. (1999)** Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein *Ntsut3* from tobacco. *FEBS Lett* 454, 325-330
- Lockhart, J. A. (1965 )** An analysis of irreversible plant cell elongation. *J Theor Biol* 8, 264-275
- Long, J. (2002)** Non radioactive *in situ* hybridization. Information Technology Services. <http://www.its.caltech.edu/~plantlab/protocols/insitu.htm>
- Ludevid, D., Höfte, H., Himmelblau, E. & Chrispeels, M. J. (1992)** The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein  $\gamma$ -tip in *Arabidopsis-thaliana* is correlated with cell enlargement. *Plant Physiol* 100, 1633-1639

- Marger, M. D. & Saier, M. H. (1993)** A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 18, 13-20
- Mariaux, J. B., Bockel, C., Salamini, F. & Bartels, D. (1998)** Desiccation- and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (Mips) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol Biol* 38, 1089-1099
- Maurel, C. (1997)** Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu Rev Plant Phys Plant Mol Biol* 48, 399-429
- Maurel, C. & Chrispeels, M. J. (2001)** Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol* 125, 135-138
- Maurel, C., Chrispeels, M. J., Lurin, C., Tacnet, F., Geelen, D., Ripoché, P. & Guern, J. (1997)** Function and regulation of plant seed aquaporins. *J. Exp. Bot.* 48, 421-430
- Maurel, C., Kado, R. T., Guern, J. & Chrispeels, M. J. (1995)** Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin  $\alpha$ -TIP. *EMBO J* 14, 3028-3035
- Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J. I. & Chrispeels, M. J. (1993)** The vacuolar membrane protein  $\gamma$ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 12, 2241-2247
- Maurel, C., Tacnet, F., Guclu, J., Guern, J. & Ripoché, P. (1997)** Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7103-7108
- McQueen-Mason, S., Durachko, D. M. & Cosgrove, D. J. (1992)** Two endogenous proteins that induce cell-wall extension in plants. *Plant Cell* 4, 1425-1433
- Meshcheryakov, A., Steudle, E. & Komor, E. (1992)** Gradients of turgor, osmotic-pressure, and water potential in the cortex of the hypocotyl of growing *Ricinus* seedlings - effects of the supply of water from the xylem and of solutes from the phloem. *Plant Physiol* 98, 840-852
- Mitsuoka, K., Murata, K., Walz, T., Hirai, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A. & Fujiyoshi, Y. (1999)** The structure of aquaporin-1 at 4.5-Å resolution reveals short  $\alpha$ -helices in the center of the monomer. *J Struct Biol* 128, 34-43
- Mohr, G. & Ziegler, H. (1969)** Symposium über Morphaktine. Stuttgart
- Molz, F. J. & Boyer, J. S. (1978)** Growth-induced water potentials in plant-cells and tissues. *Plant Physiol* 62, 423-429
- Morillon, R. & Lassalles, J. P. (1999)** Osmotic water permeability of isolated vacuoles. *Planta* 210, 80-84
- National Center for Biotechnology Information (2003)** Blast. National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Nonami, H. & Boyer, J. S. (1993)** Direct demonstration of a growth-induced water potential gradient. *Plant Physiol* 102, 13-19
- Nonami, H., Wu, Y. J. & Boyer, J. S. (1997)** Decreased growth-induced water potential - primary cause of growth inhibition at low water potentials. *Plant Physiol* 114, 501-509
- O' Brien, M., Bertrand, C. & Matton, D. P. (2002)** Characterization of a fertilization-induced and developmentally regulated plasma-membrane aquaporin expressed in reproductive tissues, in the wild potato *Solanum chacoense* bitt. *Planta* 215, 485-493
- Okamoto, H., Miwa, C., Masuda, T., Nakahori, K. & Katou, K. (1990)** Effects of auxin and anoxia on the cell-wall yield threshold determined by negative-pressure jumps in segments of cowpea hypocotyl. *Plant Cell Physiol* 31, 783-788
- Paganelli, C. V. & Solomon, A. K. (1957)** The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane. *J Gen Physiol* 41, 259-277
- Peters, W. S. & Tomos, A. D. (1996)** The history of tissue tension. *Ann Bot* 77, 657-665
- Peters, W. S. & Tomos, A. D. (2000)** The mechanic state of "inner tissue" in the growing zone of sunflower hypocotyls and the regulation of its growth rate following excision. *Plant Physiol* 123, 605-612
- Peters, W. S. & Tomos, D. (1996)** The epidermis still in control? *Botanica Acta* 109, 264-267
- Phillips, A. L. & Huttly, A. K. (1994)** Cloning of 2 gibberellin-regulated cDNAs from *Arabidopsis thaliana* by subtractive hybridization - expression of the tonoplast water channel,  $\gamma$ -tip, is increased by Ga(3). *Plant Mol Biol* 24, 603-615
- Pih, K. T., Kabilan, V., Lim, J. H., Kang, S. G., Piao, H. L., Jin, J. B. & Hwang, I. (1999)** Characterization of two new channel protein genes in *Arabidopsis*. *Mol Cells* 9, 84-90
- Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B. & Agre, P. (1992)** Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256, 385-387
- Quigley, F., Rosenberg, J. M., Shachar-Hill, Y. & Bohnert, H. J. (2002)** From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biol* 3, 1-17
- Ramahaleo, T., Morillon, R., Alexandre, J. & Lassalles, J. P. (1999)** Osmotic water permeability of isolated protoplasts. Modifications during development. *Plant Physiol* 119, 885-96
- Reed, J. W., Nagpal, P., Poole, D. S., Furuya, M. & Chory, J. (1993)** Mutations in the gene for the red far-red light receptor phytochrome-b alter cell elongation and physiological-responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 5, 147-157
- Reisen, D., Loborgne-Castel, N., Ozalp, C., Chaumont, F. & Marty, F. (2003)** Expression of a cauliflower tonoplast aquaporin tagged with gfp in tobacco suspension cells correlates with an increase in cell size. *Plant Mol Biol* 52, 387-400

- Reizer, J., Reizer, A. & Saier, M. H. (1993)** The mip family of integral membrane channel proteins - sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional-differentiation of the 2 repeated halves of the proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 28, 235-257
- Rentsch, D., Laloi, M., Rouhara, I., Schmelzer, E., Delrot, S. & Frommer, W. B. (1995)** NTR1 encodes a high-affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 370, 264-268
- Rivers, R. L., Dean, R. M., Chandy, G., Hall, J. E., Roberts, D. M. & Zeidel, M. L. (1997)** Functional analysis of nodulin 26, an aquaporin in soybean root nodule symbiosomes. *J Biol Chem* 272, 16256-16261
- Roberts, D. M. & Harmon, A. C. (1992)** Calcium-modulated proteins - targets of intracellular calcium signals in higher-plants. *Annu Rev Plant Phys Plant Mol Biol* 43, 375-414
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001)** *Molecular Cloning*, Ed 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Santoni, V., Gerbeau, P., Javot, H. & Maurel, C. (2000)** The high diversity of aquaporins reveals novel facets of plant membrane functions. *Curr Opin Plant Biol* 3, 476-481
- Sarda, X., Tusch, D., Ferrare, K., Legrand, E., Dupuis, J. M., Casse-Delbart, F. & Lamaze, T. (1997)** Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *Plant J* 12, 1103-1111
- Sauer, N. & Stolz, J. (1994)** SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J* 6, 67-77
- Schmalstig, J. G. & Cosgrove, D. J. (1990)** Coupling of solute transport and cell expansion in pea stems. *Plant Physiol* 94, 1625-1633
- Schägger, H. & Jagow, G. (1987)** Tricine-sodium dodecyl sulfat-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379
- Siefritz, F., Tyree, M. T., Lovisolo, C., Schubert, A. & Kaldenhoff, R. (2002)** PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell* 14, 869-876
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. & Bresinsky, A. (1991)** *Strasburger Lehrbuch der Botanik*, 33. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York
- Stadler, R., Brandner, J., Schulz, A., Gahrtz, M. & Sauer, N. (1995)** Phloem loading by the PmSUC2 sucrose carrier from *Plantago-major* occurs into companion cells. *Plant Cell* 7, 1545-1554
- Stadler, R. & Sauer, N. (1996)** The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Botanica Acta* 109, 299-306

- Stadler, R., Truernit, E., Gahrtz, M. & Sauer, N. (1999)** The Atsuc1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant J* 19, 269-278
- Steudle, E. (1993a)** Pressure probe techniques. Guideline for practical application of pressure probes. Available from Prof. Ernst Steudle, Lehrstuhl Pflanzenökologie, Bayreuth
- Steudle, E. (1993b)** Pressure probe techniques: Basic principles and application to studies of water and solute relations at the cell, tissue and organ level. 5-36
- Steudle, E. (1994)** Water transport across roots. *Plant And Soil* 167, 79-90
- Steudle, E. & Boyer, J. S. (1985)** Hydraulic resistance to radial water-flow in growing hypocotyl of soybean measured by a new pressure-perfusion technique. *Planta* 164, 189-200
- Tang, A. C. & Boyer, J. S. (2002)** Growth-induced water potentials and the growth of maize leaves. *J Exp Bot* 53, 489-503
- Tanner, W. & Caspari, T. (1996)** Membrane transport carriers. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 595-626
- The Nobel Foundation (2003)** The nobel prize in chemistry 2003. The Nobel Foundation. <http://www.nobel.se/chemistry/laureates/2003/index.html>
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997)** The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25, 4876-4882
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354
- Tyerman, S. D., Bohnert, H. J., Maurel, C., Steudle, E. & Smith, J. A. C. (1999)** Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *J Exp Bot* 50, 1055-1071
- Tyerman, S. D., Niemietz, C. M. & Bramley, H. (2002)** Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ* 25, 173-194
- Uehlein, N., Lovisolo, C., Siefritz, F. & Kaldenhoff, R. (2003)** The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions. *Nature* 425, 734-737
- Van Balkom, B. W. M., Savelkoul, P. J. M., Markovich, D., Hofman, E., Nielsen, S., Van Der Sluijs, P. & Deen, P. M. T. (2002)** The role of putative phosphorylation sites in the targeting and shuttling of the aquaporin-2 water channel. *J Biol Chem* 277, 41473-41479
- Van de Loo, F. J., Turner, S. & Somerville, C. (1995)** Expressed sequence tags from developing castor seeds. *Plant Physiol* 108, 1141-1150

- Verkman, A. S. & Mitra, A. K. (2000)** Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 278, 13-28
- Walworth, N. C. & Novick, P. J. (1987)** Purification and characterization of constitutive secretory vesicles from yeast. *J Cell Biol* 105, 163-174
- Ward, J. (2003)** Arabidopsis membrane protein library. University of Minnesota The College of Biological Sciences. <http://www.cbs.umn.edu/arabidopsis/>
- Wayne, R. & Tazawa, M. (1990)** Nature of the water channels in the internodal cells of *Nitellopsis*. *J Membr Biol* 116, 31-39
- Weaver, C. D. & Roberts, D. M. (1992)** Determination of the site of phosphorylation of nodulin 26 by the calcium-dependent protein kinase from soybean nodules. *Biochemistry* 31, 8954-8959
- Weig, A., Deswarte, C. & Chrispeels, M. J. (1997)** The major intrinsic protein family of *Arabidopsis* has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiol* 114, 1347-1357
- Weig, A. & Eisenbarth, D. (2000)** Role of aquaporins during elongation growth of castor bean seedlings. In Hohmann, S., Nielsen S., *Molecular biology and physiology of water and solute transport*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow
- Weig, A., Franz, J., Sauer, N. & Komor, E. (1994)** Isolation of a family of cDNA clones from *Ricinus communis* L. with close homology to the hexose carriers. *J Plant Physiol* 143, 178-183
- Weig, A. & Komor, E. (1996)** An active sucrose carrier (Scr1) that is predominantly expressed in the seedling of *Ricinus communis* L. *J Plant Physiol* 147, 685-690
- Weig, A. R. (1994)** Molekularbiologische Analyse der Hexose- und Saccharosecarrier aus *Ricinus communis* L.: Klonierung und Sequenzierung, heterologe Expression und Bestimmung der Verteilung in der Pflanze. Dissertation Universität Bayreuth
- Weig, A. R. & Jakob, C. (2000)** Functional identification of the glycerol permease activity of *Arabidopsis thaliana* NLM1 and NLM2 proteins by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 481, 293-298
- Williams, L. E., Lemoine, R. & Sauer, N. (2000)** Sugar transporters in higher plants - a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science* 5, 283-290
- Yamada, S., Komori, T., Myers, P. N., Kuwata, S., Kubo, T. & Imasaeki, H. (1997)** Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiol* 38, 1226-1231





## 7 Anhang

### Statistische Auswertung der Messdaten aus Kap. 3.3, Abb. 11:

Tab. XIII: Signifikanzniveaus der Daten aus den Zelldrucksondenmessungen (Abb. 11)

		Turgor P	elast. Modul $\epsilon$	Halbwertsz. T	Hyd. Leitf. $L_p$
Hypokotylzonen <sup>1</sup>	$E_D$	1:4(*), 2:4(*)	2:4(*)	1:3(*)	--
	$R_D$	1:2(**)	--	--	--
	$E_L$	3:4(*)	2:4(***), 2:5(*), 3:4(*), 3:5(*)	--	--
Tiefenklassen <sup>2</sup>	1	--	$E_D:R_D(**)$	--	$E_D:R_D(*)$ , $E_D:E_L(*)$
	2	$E_D:R_D(**)$ , $R_D:E_L(*)$	$E_D:E_L(***)$ , $R_D:E_L(*)$	$E_D:R_D(*)$	$E_D:E_L(*)$
	3	--	$E_D:E_L(***)$	--	--
	4	$E_D:E_L(**)$	--	--	--
	5	--	--	--	--

Angegeben sind Signifikanzniveaus zwischen den Tiefenklassen 1-5 innerhalb der verschiedenen Hypokotylzonen  $E_D$ ,  $R_D$ ,  $E_L$  (<sup>1</sup>), bzw. Signifikanzniveaus zwischen den Hypokotylzonen  $E_D$ ,  $R_D$ ,  $E_L$  innerhalb der verschiedenen Tiefenklassen 1-5 (2). Statistischer Test: U-Test nach Mann & Whitney, zweiseitig; Signifikanzniveaus:  $P \leq 0,05$ : \*;  $P \leq 0,025$ : \*\*;  $P \leq 0,01$ : \*\*\*

**Vollständige Nukleotidsequenzen der inserts der Plasmide pP2L, pP5L und pT4L sowie die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von RcPIP1-1, RcPIP2-1 und RcTIP1-1 (Abb. 36, Abb. 37, Abb. 38):**

AAACGGTCATTAATCCTTCCCTTTAGTTCTTGCATTTTTCAGCTCAAGAAAAAGGAAAGAAGAGTAAGTACTAGCTTGCCT	-1
ATGAGGGCAAAGAAGATGTTAGATTGGGAGCTAACAGTACAGGAAACGCAGCCGATTGGAACGGCTGCTCAAAGCCAAGATGATAAGGATTATA	100
M E G K E E D V R L G A N K Y R E T Q P I G T A A Q S Q D D K D Y T	34
CAGAGCCACCACCGCGCCTCTGTTTGAGCCTGGCGAGTTGACTTCATGGTCGTTTTATAGAGCTGGAATTGCAGAGTTCATAGCGACTTTCTTGTCTT	200
E P P P A P L F E P G E L T S W S F Y R A G I A E F I A T F L F L	67
GTATATCTCTGTTTACTGTTATGGGTGTTGTTAAAGCACCCACTAAATGCTCCACTGTTGGTATTCAAGGGATTGCTTGGGCCTTTGGTGGCATGATC	300
Y I S V L T V M G V V K A P T K C S T V G I Q G I A W A F G G M I	100
TTTGCTCTTGTTTACTGTACTGCTGGAATTTACAGGAGGACACATAAACCCAGCCGTGACCTTCGGGCTGTTTCTGGCGAGGAAGTTGTCGTTGACAAGG	400
F A L V Y C T A G I S G G H I N P A V T F G L F L A R K L S L T R A	134
CTTTGTTCTACATGGTGATGAGTGCCTTGGAGCCATATGCGGTGCTGGTGTAGTAAAGGATTTGAAGGTAGTCATGACTACACTAGGTTGGGCGGTGG	500
L F Y M V M Q C L G A I C G A G V V K G F E G S H D Y T R L G G G	167
TGCTAACAGTGTCAACCTGTTACACCAAGGTGATGGTCTTGGTGTGAAATTGTTGGTACCTTTGTTCTTGTACACCGTCTTCTCTGCCACTGAT	600
A N S V N P G Y T K G D G L G A E I V G T F V L V Y T V F S A T D	200
GCCAAACGTAGTGCCAGAGACTCCCATGTTCTTATTTGGCACCATTGCCAATTGGGTTTCGAGTTTCTTGGTGCACCTTGGCTACTATCCCAATTACAG	700
A K R S A R D S H V P I L A P L P I G F A V F L V H L A T I P I T G	234
GAACCGGGATCAACCCAGCCCGTAGTCTTGGTGCAGCAATCATCTTCAACAAGGACCAAGGCTGGGATGATCATTGGATTCTTGGGTTGGGTCATTATC	800
T G I N P A R S L G A A I I F N K D Q G W D D H W I F W V G P F I	267
TGGGGCAGCACTTGCAGCTCTCTACCAAGTTGTGATCAGAGCCATTCTTTCAAGAAATGCTGAAGATGATGATGCATCCATGTGTGACCGTTTGAT	900
G A A L A A L Y H Q V V I R A I P F K K C *	288
GTTTCAAAATCAAGTTTGTTCATTCTATCTGTTTGTCTTCTGCTGCACCTGTATTATATAGCACATGTAATAATAGTAGTTGTTATTATGCTTCTAG	1000
CAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1015

**Abb. 36: Vollständige Sequenz des Inserts von pP2L mit offenem Leseraster für RcPIP1-1**

Die für *RcPIP1-1* codierende Nukleotidsequenz und deren abgeleitete AS-Sequenz sind grau hinterlegt. Start- und Stopcodons sind rot dargestellt. Am rechten Rand sind die Nukleotid- und AS-Positionen angegeben (1 = Startcodon).

GCAACACAAATTAGCTTCAGCGCAGCAGCAAAGCTAGCTAACAAAGAGAGCTTTTTTGGCTTTGCACAGAGAGAGAGAGACAG	-1
ATGGCGAAGGATGTGGGTGAAGAAACACAACTAGCCATGGAAAGGATTATGTGGATCCACCACCAGCACCCTTGTGACATGGCTGAACCTCAAGCTCT	100
M A K D V G E E T Q T S H G K D Y V D P P P A P L V D M A E L K L W	34
GGTCTTTCTACAGAGCTCTTATAGCTGAGTTCATAGCTACTCTCTCTCTCTACATCACCGTAGCTACTGTAATTGGCTATAAGAAACAACTGACCC	200
S F Y R A L I A E F I A T L L F L Y I T V A T V I G Y K K Q T D P	67
ATGTGGTGGAGTTGGTATCTTGGGTATTGCATGGGCCTTTGGTGGCATGATCTTTATCCTTGTCTACTGCACTGCTGGTATCTCTGGTGGTCATATTAAT	300
C G G V G I L G I A W A F G G M I F I L V Y C T A G I S G G H I N	100
CCTGCTGTACTTTTGGGCTGTCTTGGCCAGGAAGGTGTCACTGATTAGGGCTGTAGCTTACATGGTGGCTCAGTCTTGGGTGCAATCTGTGGTGTG	400
P A V T F G L F L A R K V S L I R A V A Y M V A Q C L G A I C G V G	134
GTTTGGTTAAGGCTTTTATGAAGAATCCTTACAACCGTCTAGGTGGTGGTGTAAGTCTGTGGCTTCTGGCTACAGCAACGGCACAGCTTTGGGGGTGA	500
L V K A F M K N P Y N R L G G G A N S V A S G Y S N G T A L G A E	167
GATCATTGGAACCTTTTGTCTTGTCTTACACTGTTTCTCTGCGACTGACCTTAAGAGAAGTGCACGTGACTCTCACGTTCTGTTTGGCTCCACTCCCA	600
I I G T F V L V Y T V F S A T D P K R S A R D S H V P V L A P L P	200
ATCGGGTTTGCTGTATTTATGGTCCACTTAGCTACAATCCCATCACTGGTACTGGTATTAACCCAGCCAGGAGCTTTGGAGCTGCTGTCATCTACAACA	700
I G F A V F M V H L A T I P I T G T G I N P A R S F G A A V I Y N N	234
ATGACAAAGTGTGGGATGACCATGGATTTTCTGGGTGGACCTTTTGGTGGAGCACTGGCAGCAGCTGCATACCATCAATACGTACTGAGAGCAGCAGG	800
D K V W D D H W I F W V G P F V G A L A A A A Y H Q Y V L R A A G	267
CATCAAGGCCTTGGGATCTTTCCGTAGCAACCTACCAACTAAAGGAAGAACCTTTCACCCCAAAAGGAAAAATTGAAAAACAAAAGCTTGTCTATCC	900
I K A L G S F R S N P T N *	280
ATCCATTGTGTTGTTTGTGTTGTGTGTACGAGAGGATTATTATGATGACCCATTCCACTTCAATTTTAATCTTTCTTTTGTGTTAATTAATTAATTTAGTA	1000
GTCTGGCTGTGATTATTGTTATTGAGTAGTGGTACTGTTTCTTCTCTCTTTCTTCTTATTATTGGTCTGTGCAGTGAAGAAAGAAATCTAATATA	1100
TTTTCTCTTACTCTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1035

**Abb. 37: Vollständige Sequenz des Inserts von pP5L mit offenem Leseraster für *RcPIP2-1***

Die für *RcPIP2-1* codierende Nukleotidsequenz und deren abgeleitete AS-Sequenz sind grau hinterlegt. Start- und Stopcodons sind rot dargestellt. Am rechten Rand sind die Nukleotid- und AS-Positionen angegeben (1 = Startcodon).

```

                                GTGCNCTGCCTCGCAGGCGAAGACCACAGCTCAGCGTTTGATCCAAAA -1
ATGCCGATCAGAAACATCGCCGTTGGCCATCCACATGAGGCGACTCAGCCCGACGCCCTTAAAGCGCGCGTTGGCTGAGTTTATCTCAACTCTTATTTTGG 100
M P I R N I A V G H P H E A T Q P D A L K A A L A E F I S T L I F V 34
TCTTCGCCGGAGAAGGTTCCGGTATGGCCTTTAACAAGCTCACCAACAACGGCGTAGCCACTCCTTCTGGTCTCGTGGCCGCCGCTATAGCTCAGGCATT 200
F A G E G S G M A F N K L T N N G V A T P S G L V A A A I A H A F 67
CGCTCTTTTGTGTGCTCCTCGTTGGTGCAAACATCTCAGGTGGACATGTCAATCCTGCTGTCACCTTTGGTGCTTTCGTCGGCGGTAACATCACTCTT 300
A L F V A V S V G A N I S G H V N P A V T F G A F V G G N I T L 100
CTACGTGGTATTCTTTACTGGTTCGCTCAGCTTCTCGGCTCCACCGTCGCTTGCTTGCTTCTCAAGTTCAGTACCGCGGTTTGACTACCTCAGCTTTTCG 400
L R G I L Y W F A Q L L G S T V A C L L L K F S T G G L T T S A F A 134
CTCTATCCTCTGGAGTTGGTGTATGGAACGCACTTGTTCGAAATCGTGATGACCTTTGGACTTGTGTATACCGTATATGCAACTGCCGTTGATCCAAA 500
L S S G V G V W N A F V F E I V M T F G L V Y T V Y A T A V D P K 167
GAAGGGAAGTTTGGGAACAATTGCACCGATCGCTATCGGTTTTATCGTTGGTGCTAACATTTTGGCGGGAGGAGCATTGACGGTGCATCAATGAACCCC 600
K G S L G T I A P I A I G F I V G A N I L A G G A F D G A S M N P 200
GCAGTGTCGTTCCGACCAGCTTTGGTCAGCTGGAGCTGGGAAAACTACTGGGTGTACTGGGCTGGGCCTTTAGTTGGCGGTGGGCTTGCTGGGCTTGTTT 700
A V S F G P A L V S W S W E N H W V Y W A G P L V G G G L A G L V Y 234
ATGAGTTCTTCTTCATCCACAGCACCCATGAGCAGCTCCCTACCACTGACTACTAAAGATAACGGTGGTTGCGAGTGGATGGCATGAAGTGGTGGCGG 800
E F F F I H S T H E Q L P T T D Y * 251
TGGCCACGCGGCTTTTCTTCTCTGGTGATTTATTGTATCTCTTGAGGTATTTTATTTATCCTGTTATTTAATCTGTAATCGTCGATCTTTGGTTTT 900
TCTTTTTCATCATTATCGATCCAAGGGTGTGATTTGTGTATTCTGATCCGGTTGTATTATTCTCATTTCAGACATCCTATCGTCCCGTATTTTCGCCT 1000
CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1009

```

**Abb. 38: Vollständige Sequenz des Inserts von pT4L mit offenem Leseraster für *RcTIP1-1***

Die für *RcTIP1-1* codierende Nukleotidsequenz und deren abgeleitete AS-Sequenz sind grau hinterlegt. Start- und Stopcodons sind rot dargestellt. Am rechten Rand sind die Nukleotid- und AS-Positionen angegeben (1 = Startcodon).

---

## Abkürzungsverzeichnis

A	dATP
Acc. No.	Zugangsnummer am NCBI
AD	destilliertes Wasser
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid
ähnli.	ähnlich
AP	Alkalische Phosphatase
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	dCTP
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)-Tetraessigsäure
G	dGTP
gRNA	Gesamt-RNA
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
Hg <sup>++</sup>	Quecksilberionen
Hz	Hertz
i.d.R.	In der Regel
ident.	identisch
kD	Kilodalton
MES	2-(N-Morpholin)ethansulfonsäure
MMA	Hefe-Minimalmedium
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogenkarbonat
NaOAc	Natriumacetat
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	Laurylsulfat
sog.	sogenannter/e/s
SSC	<i>saline sodium citrat</i>
T	dTTP
Tris	Tris Pufferan®
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolettes Licht
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

**Physikalische/mathematische Parameter & Einheiten**

$A$	Oberfläche	$[m^2]$
$^{\circ}C$	Grad Celsius	
$\mu m$	Mikrometer	
$d$	Tag	
$g$	Erdbeschleunigung	$[m/s^2]$
$h$	Stunde	
$Hz$	Hertz	
$kV$	Kilovolt	
$l$	Liter	
$L$	mittlerer hydraulischer Leitwert	$[s \cdot MPa]$
$L_p$	hydraulische Wasserleitfähigkeit	$[\mu m/s \cdot MPa]$
$m$	Meter	
$M$	molar	
$m$	volumetrische Extensibilität	$[1/s \cdot MPa]$
$min$	Minuten	
$ml$	Milliliter	
$mm$	Millimeter	
$MPa$	Megapascal	
$nm$	Nanometer	
$OsM$	osmolar	
$P$	Zellturgor	$[MPa]$
$P_f$	osmotische Wasserpermeabilität	$[\mu m/s]$
$R$	allgemeine Gaskonstante	$[J/mol \cdot K]$
$r_h$	hydrodynamischer Radius	$[nm]$
$RT$	Raumtemperatur	$[^{\circ}C]$
$s$	Sekunden	
$T$	absolute Temperatur	$[K]$
$T$	Temperatur	$[^{\circ}C]$
$t$	Zeit	$[s]$
$T_{1/2}$	Halbwertszeit hydrostatischer Druckrelaxationen	$[s]$
$V$	Volumen	$[m^3]$
$V_w$	molares Volumen von Wasser	$[l/mol]$
$Y$	kritischer Turgor ( <i>yield threshold</i> )	$[MPa]$
$\Delta P$	Änderung des Zellturgors	$[MPa]$
$\Delta V$	Volumenänderung	$[m^3]$
$\Delta \Psi$	Gradient des Wasserpotentials	$[MPa]$
$\Delta \Psi_{\pi}$	Gradient des osmotischen Potentials	$[MPa]$
$\Psi$	Wasserpotential	$[MPa]$
$\Psi_{\pi}$	osmotisches Potential	$[MPa]$
$\varepsilon$	elastischer Modul	$[MPa]$

Alle Abkürzungen gelten für Singular und Plural gleichermaßen.

---

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das Expansionswachstum pflanzlicher Zellen und die involvierten Prozesse (schematische Übersicht aus Cosgrove, 1997) .....	3
Abb. 2: Versuchsanordnung für Messungen mit der Zelldrucksonde.....	16
Abb. 3: Schematische Aufteilung des Hypokotylkortex von <i>Ricinus</i> in radialer Richtung .....	19
Abb. 4: <i>Ricinus</i> -Keimlinge mit etioliertem Hypokotyl.....	33
Abb. 5: Längenentwicklung der verschiedenen Hypokotylsegmente, während der Kultivierung von Keimlingen im Dunkeln (A) und unter Weißlichtbestrahlung (C).....	34
Abb. 6: Relative Volumenzunahme in der Elongationszone ( $E_D$ ) und dem reifen Hypokotyl ( $R_D$ ) dunkel gehaltener, sowie der in der 'Elongationszone' belichteter Keimlinge ( $E_L$ )..	35
Abb. 7: Einfluss der Lichtqualität auf die Ausbildung einer Elongationszone. ....	35
Abb. 8: Die osmotische Wasserpermeabilität ( $P_f$ ) von Protoplasten und Vakuolen aus den unterschiedlich elongierenden Abschnitten des <i>Ricinus</i> -Hypokotyls .....	36
Abb. 9: Die osmotische Wasserpermeabilität ( $P_f$ ) von Vakuolen aus den unterschiedlich elongierenden Abschnitten des <i>Ricinus</i> -Hypokotyls verteilt nach Zellvolumen.....	37
Abb. 10: Zellvolumen in unterschiedlichen Tiefenschichten des Hypokotylkortex. ....	38
Abb. 11: Radiäre Verteilung von Parametern des zellulären Wasserhaushalts im Kortex der verschiedenen Hypokotylzonen von belichteten und unbelichteten Keimlingen. ....	39
Abb. 12: Hydropathieprofile von RcPIP1-1, RcPIP2-1 und RcTIP1-1 .....	45
Abb. 13: (gegenüberliegende Seite) Vergleichendes <i>alignment</i> der drei <i>Ricinus</i> -MIP (unterstrichen) mit Vertretern der wichtigsten pflanzlichen Unterfamilien (PIP, TIP, NIP) und monophyletischen Gruppen (PIP1/2, TIP1/3), sowie der tierischen und prokaryontischen Aqua- und Glyzeroporine .....	46
Abb. 14: <i>northern</i> -Hybridisierung von MIP-spezifischen Sonden mit gRNA aus den Hefetransformanten mit <i>RcPIP1-1</i> (P1), <i>RcPIP2-1</i> (P2), <i>RcTIP1-1</i> (T1) sowie der Vektorkontrolle (DR) .....	52
Abb. 15: Immunoblot von vesikulärem Membranprotein aus den Hefetransformanten mit <i>RcPIP1-1</i> (P1), <i>RcPIP2-1</i> (P2), <i>RcTIP1-1</i> (T1) und pDR195 (DR) sowie mikrosomalem Membranprotein aus <i>Ricinus</i> -Hypokotyl als Positivkontrolle (H). ....	52
Abb. 16: Isolierte Trans-Golgi-Vesikel in einer EM-Aufnahme.....	53
Abb. 17: Größenverteilung (A) und Median (B) des Volumens isolierter <i>post-golgi</i> Vesikel.	54
Abb. 18: Charakteristische Schrumpfungskinetiken isolierter <i>post-Golgi</i> Vesikel in hypertonischem Medium.....	55
Abb. 19: Temperaturabhängigkeit der $P_f$ von Membranen kleiner (A) und größer (B) <i>post-golgi</i> Vesikel aus den MIP-transformierten Hefeklonen .....	56
Abb. 20: Quantifizierung der Transkripte von <i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> entlang der Hypokotylachse dunkel gehaltener und belichteter <i>Ricinus</i> -Keimlinge .....	57
Abb. 21: Expressionsanalyse von <i>RcPIP1-1</i> entlang der Hypokotylachse dunkel gehaltener und belichteter <i>Ricinus</i> -Keimlinge.....	58

Abb. 22: Expressionsanalyse von <i>RcPIP2-1</i> entlang der Hypokotylachse dunkel gehaltener und belichteter <i>Ricinus</i> -Keimlinge .....	59
Abb. 23: Expressionsanalyse von <i>RcTIP1-1</i> entlang der Hypokotylachse dunkel gehaltener und belichteter <i>Ricinus</i> -Keimlinge .....	59
Abb. 24: Repräsentatives Proteingel für die immunologischen Quantifizierungen .....	60
Abb. 25: Quantifizierung von <i>RcPIP1-1</i> entlang der Hypokotylachse dunkel gehaltener und belichteter <i>Ricinus</i> -Keimlinge .....	61
Abb. 26: Quantifizierung von <i>RcPIP2-1</i> entlang der Hypokotylachse dunkel gehaltener und belichteter <i>Ricinus</i> -Keimlinge .....	61
Abb. 27: Quantifizierung von <i>RcTIP1-1</i> entlang der Hypokotylachse dunkel gehaltener und belichteter <i>Ricinus</i> -Keimlinge .....	62
Abb. 28: (gegenüber liegende Seite) Immunolokalisierung von <i>RcPIP1-1</i> im Hypokotyl dunkel gehaltener und belichteter <i>Ricinus</i> -Keimlinge .....	62
Abb. 29: (siehe nächste Seite) Lokalisierung von <i>RcPIP2-1</i> im Hypokotyl dunkel gehaltener und belichteter <i>Ricinus</i> -Keimlinge mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	64
Abb. 30: Immunolokalisierung von <i>RcPIP2-1</i> in den verschiedenen Zonen des <i>Ricinus</i> -hypokotyls .....	66
Abb. 31: (gegenüberliegende Seite) Immunolokalisierung von <i>RcTIP1-1</i> im Hypokotyl dunkel gehaltener und belichteter <i>Ricinus</i> -Keimlinge .....	68
Abb. 32: (übernächste Seite) Immunolokalisierung von <i>RcTIP1-1</i> in einem Leitbündel der Zellteilungszone eines dunkel gehaltenen <i>Ricinus</i> -Keimlings .....	68
Abb. 33: Quantifizierung der Transkripte von <i>RcSCR1</i> , <i>RcSCR2</i> , <i>RcHEX1</i> , <i>RcHEX3</i> und <i>RcHEX6</i> entlang der Hypokotylachse dunkel gehaltener und belichteter <i>Ricinus</i> -Keimlinge .....	71
Abb. 34: Immunolokalisierung von <i>RcSCR1</i> im Hypokotyl von dunkel gehaltenen und belichteten <i>Ricinus</i> -Keimlingen (Legende, siehe gegenüberliegende Seite) .....	73
Abb. 35: Lokalisierung von Stärke im Hypokotyl von <i>Ricinus</i> -Keimlingen .....	74
Abb. 36: Vollständige Sequenz des Inserts von pP2L mit offenem Leseraster für <i>RcPIP1-1</i> .....	114
Abb. 37: Vollständige Sequenz des Inserts von pP5L mit offenem Leseraster für <i>RcPIP2-1</i> .....	115
Abb. 38: Vollständige Sequenz des Inserts von pT4L mit offenem Leseraster für <i>RcTIP1-1</i> .....	116



---

## Tabellenverzeichnis

Tab. I: Plasmide als <i>template</i> zur Herstellung Digoxigenin-markierter cDNA-Sonden .....	21
Tab. II: Primerpaare, die zur Amplifikation spezifischer cDNA verwendet wurden .....	25
Tab. III: Digoxigenin-markierte <i>RNA</i> -Sonden zur Detektion spezifischer <i>mRNA</i> .....	26
Tab. IV: Peptide, gegen die spezifische Antikörper synthetisiert wurden.....	28
Tab. V: Versuchsbedingungen bei der Lokalisierung spezifischer Proteine.....	30
Tab. VI: Modellberechnung des Wasserpotentials ( $\Delta\Psi_c$ ), der volumetrischen Extensibilität ( $m_c$ ) und des mittleren hydraulischen Leitwerts ( $L_c$ ) im elongierenden Hypokotylkortex	41
Tab. VII: Die zehn bekannten <i>Ricinus-MIP</i> und deren ähnlichste <i>Homologe aus Arabidopsis thaliana</i> .....	42
Tab. VIII: Plasmide aus dem <i>screening</i> einer <i>Ricinus</i> -Hypokotyl-cDNA-Bank mit spezifischen Sonden für <i>RcPIP1-1</i> , <i>RcPIP2-1</i> und <i>RcTIP1-1</i> . .....	43
Tab. IX: RcPIP1-1 und die nahestehendsten PIP1 anderer pflanzlicher Spezies .....	49
Tab. X: RcPIP2-1 und die nahestehendsten PIP2 anderer pflanzlicher Spezies .....	49
Tab. XI: RcTIP1-1 und die nahestehendsten TIP1 anderer pflanzlicher Spezies.....	50
Tab. XII: Osmotische Wasserpermeabilität ( $P_f$ ) und Aktivierungsenergie ( $E_a$ ) von Vesikelmembranen der <i>MIP</i> -transgenen Hefeklone .....	56
Tab. XIII: Signifikanzniveaus der Daten aus den Zelldrucksondenmessungen (Abb. 11) ..	113



Mein großer Dank gilt allen Personen, die durch ihr Engagement einen wesentlichen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben. Dabei sind hervorhebend zu erwähnen:

- Prof. Dr. Ewald Komor für die Überlassung des Themas, die hilfreichen fachlichen Anregungen sowie die sehr angenehme Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe.
- Dr. Alfons Weig für die äußerst bereichernde wissenschaftliche Zusammenarbeit, sein außerordentliches Engagement und seine konstruktive Kritik während der Anfertigung meiner Arbeit sowie seine wertvollen Dienste in allen Belangen der EDV.
- Prof. Dr. Erwin Beck und allen Mitarbeitern seines Lehrstuhls für den motivierenden wissenschaftlichen Austausch sowie die gute Arbeitsatmosphäre.
- Prof. Dr. Ernst Steudle für kompetente Diskussionsbeiträge zur Biophysik des pflanzlichen Wasserhaushalts sowie für technische und theoretische Hilfeleistungen seitens seines Instituts
- Burkhard Stumpf für die allzeit große Bereitschaft mit Rat, Tat und Material bei den Messungen mit der Zelldrucksonde beizustehen.
- Prof. Dr. Franz Xaver Schmid für die bereitwillige Überlassung der *stopped-flow* Anlage sowie den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Christine Magg und Raimund Maier, für die immer zuvorkommende rat- und tatkräftige Unterstützung
- Prof. Dr. Gerhard Platz, Dr. Stefan Schmölzer und Dr. Klaus Horbaschek für die Messungen der dynamischen Lichtstreuung, die elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie die Diskussionen zu den Grundlagen dieser Methoden.
- Pia Großmann für die aktive Mithilfe im Laboralltag und Ihre große Flexibilität bei besonders kurzfristigen Anliegen meinerseits.
- Shih-Long Yan für die förderliche Zusammenarbeit bei der *in situ*-Hybridisierung und Immunlokalisierung
- Andrea Kirpal für die tatkräftige Unterstützung bei allen histologischen Arbeiten
- Dr. Udo Jongebloed, Christiane Jakob, Dr. habil. Christiane Reinbothe und Dr. Sebastian Fettig für das kompetente und hilfreiche Korrekturlesen meines Manuskripts.
- Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Komor für die gute Zusammenarbeit, den wertvollen wissenschaftlichen Austausch sowie die familiäre Forschungsatmosphäre.
- Den Mitwirkenden des BZMB für den bereichernden wissenschaftlichen Austausch
- Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre Förderung des bearbeiteten Projekts
- Ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Ines Eisenbarth für die nie ermüdende, verständnis- und aufopferungsvolle "Rückendeckung" über den ganzen Zeitraum meiner Doktorarbeit aber auch das aufmerksame Korrekturlesen meines Fachchinesischs.



Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre weiterhin, dass ich weder an der Universität Bayreuth noch an einer anderen Hochschule versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, 15. August 2004

---

Daniel Augustinus Eisenbarth